

國立交通大學
環境工程研究所

碩士論文

以斑馬魚胚胎評估半導體廢水之生物毒性

Toxicity assessment of semiconductor wastewater
using zebrafish embryos

研究生：吳蕙如

指導教授：黃志彬、袁如馨 教授

中華民國 102 年 10 月

以斑馬魚胚胎評估半導體廢水之生物毒性

Toxicity assessment of semiconductor wastewater
using zebrafish embryos

研究生：吳蕙如

Student : Heiju Wu

指導教授：黃志彬、袁如馨

Advisor : Chihpin Huang

Jill Ruhsing Pan



October 2013

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國 102 年 10 月

以斑馬魚胚胎評估半導體廢水之生物毒性

研究生：吳蕙如

指導教授：黃志彬、袁如馨 教授

國立交通大學

環境工程研究所

摘要

半導體製程中常使用到許多含氮物質作為原物料，導致廢水含氮量過高，排放至水體會造成優養化及產生毒性。目前環保署公告的放流水管制標準為化學物質濃度管制，雖可有效控管各事業單位污染物的排放，卻無法反映水體生物可承受之濃度，因此目前許多國家亦使用生物毒性試驗來評估水體污染程度。相較於傳統生物毒性試驗單以死亡率為標的，斑馬魚胚胎具有繁殖容易、產量大與胚胎外觀透明等優勢，不僅可進行大量毒性暴露試驗，亦可直接使用顯微鏡觀察胚胎發育的狀態以獲得更多毒物暴露後的資訊，因此本研究選用斑馬魚(*Danio rerio*)胚胎來評估半導體廢水對水體生物的影響，此處使用模擬含氮廢水與半導體廢水進行胚胎毒性暴露試驗，所取用的半導體廢水為氟系與化學研磨製程混合廢水、製程酸鹼廢水以及經處理過的出流水，除觀察胚胎的死亡率，另選用不同的觀測終點如累積孵化率、心跳、體長與致畸率，分析含氮物質對胚胎發育產生的影響。

斑馬魚胚胎暴露於實驗室配置的氯化銨、硝酸鈉及氫氧化四甲基銨溶液，其96小時半數致死濃度值分別為111 mg NH₃-N/L、1347.3 mg NO₃⁻-N/L及68 mg N/L，最低效應濃度(Low observed effect concentration, LOEC)為0.41 mg NH₃-N/L、0.51 mg NO₃⁻-N/L及0.1 mg N/L。經含氮物質暴露後的斑馬魚，皆有累積孵化率下降、心跳次數降低、生長速度趨緩與畸形發育的現象，而畸形發育的型態有三種，暴露後出現的先後順序為脊椎彎曲，其次是心包膜腫大，最後為卵黃囊腫大。

三股半導體廢水毒性結果顯示，除了氟系與化學研磨製程混合廢水 96 小時死亡率為 77%，其他兩股廢水的死亡率皆在 20% 以下。觀察尚未死亡的斑馬魚胚胎發現累積孵化率、心跳與生長體長有發育減緩的趨勢，其中又以心跳抑制的現象最為顯著，且有脊椎彎曲、心包膜腫大與卵黃囊腫大畸形發育的情形。半導體廢水毒性試驗結果雖為低死亡率，但在終點項目的觀察可發現廢水中的毒性物質對胚胎發育有產生影響，且與模擬含氮廢水有相似的畸形發育型態，表示此毒性試驗可用於評估不同類型的暴露溶液與濃度範圍，且可給予更多的毒性訊息，對於毒性評估有很大的潛力，未來可使用此毒性暴露試驗評估毒性物質對水體的潛在危害。

關鍵字：含氮物質、半導體廢水、毒性、斑馬魚胚胎毒性試驗



Toxicity assessment of semiconductor wastewater using zebrafish embryos

Student : Heiju Wu

Advisor : Chihpin Huang

Jill Ruhsing Pan

Institute of Environmental Engineering

National Chiao Tung University

Abstract

In semiconductor manufacturing processes nitrogenous substances are extensively used, resulting in production of very high nitrogen-containing wastewater. The high concentration of nitrogen-containing wastewater discharged to aquatic environment may cause eutrophication and toxicity. Although Taiwan EPA has regulated effluent standards for many pollutants, they are not sufficient to tell us if the discharge is toxic or not. Therefore, many countries are using animals to detect the toxicity of wastewater. Traditional toxicity tests usually use mortality as endpoint, but the sensitivity of this method is not adequate for low concentration pollutants. Zebrafish embryo assay has been regarded as a suitable alternative to the fish acute toxicity test which, apart from ethical reasons, provides very limited data (only LC₅₀) and no ecotoxicological relevance. Due to transparency and extra-uterine development, zebrafish embryos can be directly observed the phenotypic changes during embryonic development. As a result, in this study zebrafish embryos were used to evaluate the toxicity and teratogenicity in nitrogen-containing wastewater. The purpose of this study is to examine the acute toxicity and developmental abnormalities in synthetic and real wastewater by using zebrafish embryos.

The results show the 96h-LC₅₀ of ammonium chloride, sodium nitrate and

tetramethylammonium hydroxide were 111 mg NH₃-N/L, 1347.3 mg NO₃⁻-N/L and 68 mg N/L, respectively; the low observed effect concentration were 0.41 mg NH₃-N/L, 0.51 mg NO₃⁻-N/L 及 0.1 mg N/L, respectively. The endpoints such as hatching rate, heart rate and body length significantly declined in these three nitrogenous solutions. Abnormalities including spinal curvature, pericardial edema and yolk sac edema were also observed in sequence in zebrafish larvae.

In real wastewater, the HF/CMP wastewater, acid-base wastewater and effluent from a semiconductor manufacturing factory were used. The mortality of zebrafish embryos in the acid-base wastewater and effluent was under 20% and 77% in HF/CMP wastewater in 96 hours. Although the mortality was low in the acid-base wastewater and effluent, the cumulative hatching rate, body length and especially heartbeat significantly decline. Abnormalities including spinal curvature, pericardial edema and yolk sac edema were also observed in real wastewater tests. The results indicate that the zebrafish embryos can be instrumental to detect the potential harm caused by wastewater on aquatic organisms at low concentrations. It suggests that embryo toxicity assay should be used to evaluate the toxicity of wastewater in the future.

Keywords: nitrogenous substances, semiconductor wastewater, toxicity, zebrafish embryo toxicity test

致謝

歷經兩年多終於完成我的碩士論文啦，想到這陣子常常看到太陽公公升起的日子，就有種莫名的感動。首先非常感謝黃志彬 教授這段時間的指導，在我準備論文期間總能即時的指引我方向，給予我莫大的幫助，還有可愛的袁如馨 教授，雖然您提前去不同的國度環遊世界，但每次經過您的辦公室依然覺得您仍伴我左右，想跟您說我已經完成我的論文了，您有看到嗎？在此還要感謝陳伯中 教授與李季眉 教授義不容辭的教導，因為某些插曲很幸運能夠在攻讀碩士學位期間接受您們細心的指導，您們對我實驗上的幫助與建議都是幫助我完成論文的動力。還有親愛的老大—張時獻 教授，您真是我的良師益友，大學時如果沒有您一步步拉著我往前邁進，我也不會有機會在這裡感謝您，大學四年除了學術上的指導，您教的待人處事的道理，直至現在我依然受用無窮，未來我會帶著您教我的精神繼續在人生路途中找尋屬於我的寶物，內化成自身的能量。如果沒有以上這些 教授，我絕對無法順利完成碩士學位，在此獻上我最深的敬意。

身為黃 Group 驕傲的一員，超級感謝大家這一路的幫忙，首先是年紀一大把了卻還是有死因仔精神的 哈利，雖然是你帶領我一起貢獻給朵莉無數的咖啡錢，依然很謝謝你這一年在生物組為我撐腰；我心目中永遠的黃家支柱 OK，當我們碩二這群小朋友做了什麼蠢事，謝謝妳永遠都是第一個站出來幫我們，每次我的心中都是無限感激，搞得我現在音頻跟你越來越像了；感謝 大王 在我超瞎掰咖的時候很 man 的背起我，還很細心的幫我處理腳傷，沒有你我怎麼辦；感謝拍照永遠側臉的走鐘采潔姐 Susu 永遠都在最緊急的時刻伸出援手幫我一把，雖然從大學時會寄激勵信件的優質學姐形象到後來變質成為搞笑諧星，回不去了~但我絕對不會忘記妳這段時間的意氣相挺；感謝很油跟愛碎碎念的 阿富，總是在我很累的時候幫我跑腿替我打氣；感謝四大金釵 小胖、Kitty、掀低、媽媽與全能 Vivi 的陪伴，小碩一時期幸好有你們罩著，我才得以茁壯成老碩二，尤其是我的好鄰居 小胖，雖然你常常按門鈴會嚇到我，但因為妳常跑來我房間，我才有機會結交妳這位有義氣的朋友，還跟 Susu 成為妳媽唱 KTV 的固定班底；感謝 芳

瑜、阿強、羽婷、昕維、Eddy與奕如，在我接近口試那段期間總是有求必應，都能幫我完成所有的請求。

與我共同度過碩士生涯的好夥伴，如果一路上沒有你們的喧鬧，我的碩士生活不會如此精采。我相信這世界上沒有 小佑不會的周星馳電影台詞，每次只要一見面對話就會出現劇中對白，而笑聲充滿特色的 嘎嘎自從發現胃幽門桿菌就變無敵了，他們兩個只要在一起自動就會變成雙簧組合；進實驗室就是鄰居的 阿凱，想當初在一館我們也算是不罵不相識，那時還時常陪學長姐寫論文到深夜；而這屆唯一的陸生也是聰明的 山山，常常都會用大陸口音講出讓我笑翻的話。雖然我是這屆唯一的女生，走在一起偶爾我會變成大家攻擊的箭靶，但就是你們吵吵鬧鬧的聲音讓我的碩士生活永遠都不無聊，曾經有苦一起吐，有開心事一起同樂，這樣度過的兩年生活你們才剛離開不久我就開始懷念了，感謝你們與我共同營造如此美好的回憶，它將會占據我心中一大位置。

感謝我大學的學長姐 恆菁學姐與大嘴學長，因為你們我在實驗室永遠不會找不到方向；感謝 彤恩與倚楨我兩位大學親愛的室友兼好朋友，大學幸好有妳們當我的指南針，讓我在很多事情少走很多冤枉路；我永遠的演唱會夥伴小燕、Stammer與采蓉，謝謝你們總會陪我去演唱會上瘋狂，並且聆聽我講生活上的瑣事；感謝 COS從高中以來一路的陪伴，不管何時只要我一通電話，妳就能瞭解我的心情。真的是少了你們哪一個都不行，每一個對我來說都是非常珍貴的。

最後，最最感激的是永遠在背後支持我的家人，感謝你們包容我的任性，並且總是在我最需要你們的時候適時出現，未來我也會以一樣的心情支持著你們。

吳蕙如 謹致於
國立交通大學環境工程研究所
中華民國 102 年 10 月

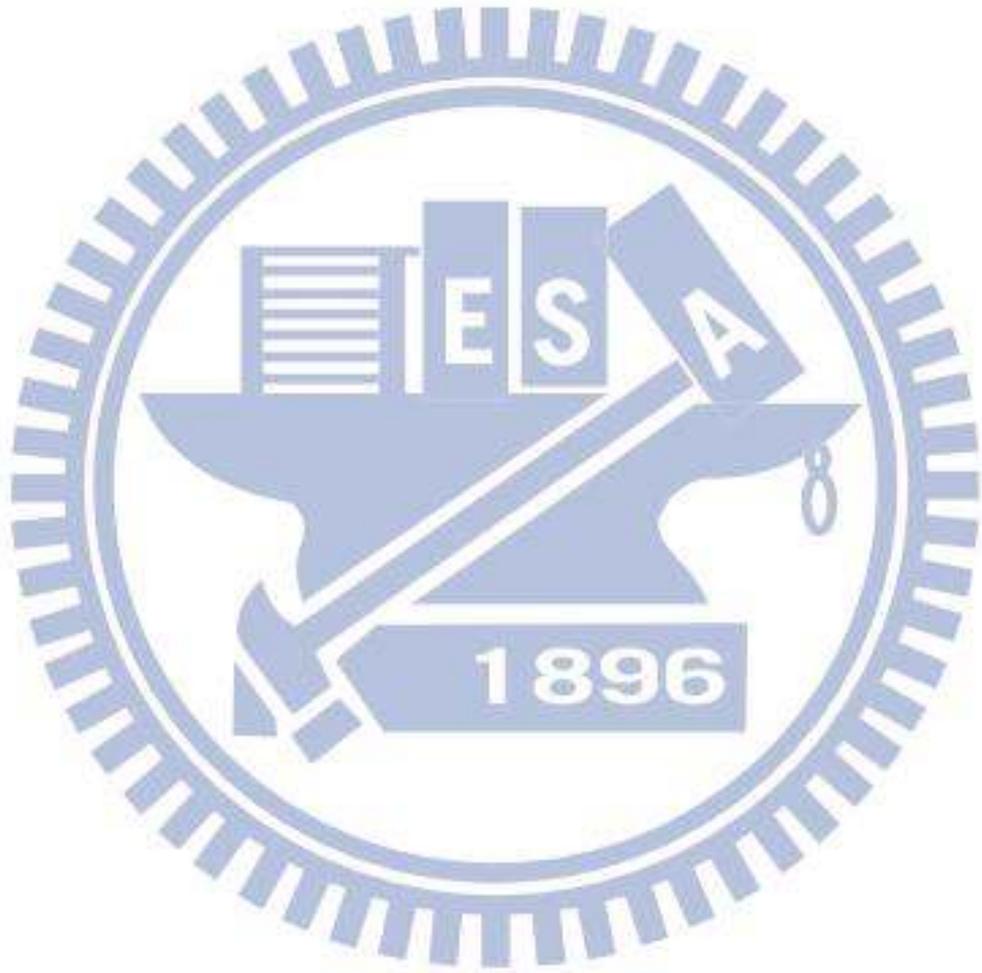
目錄

摘要.....	I
Abstract.....	III
致謝.....	V
目錄.....	VII
表目錄.....	IX
圖目錄.....	X
第一章 前言.....	1
1.1 研究背景.....	1
1.2 研究目的與內容.....	3
1.3 研究架構.....	4
第二章 文獻回顧.....	5
2.1 半導體廢水種類與特性.....	5
2.2 半導體製程廢水之含氮來源.....	6
2.2.1 含氮物質對生態環境的危害.....	7
2.3 生物毒性檢測.....	9
2.3.1 生物毒性測試方法.....	9
2.3.2 斑馬魚繁殖行為與胚胎發育特性.....	10
2.3.3 斑馬魚胚胎毒性試驗之應用.....	14
第三章 實驗材料與方法.....	17
3.1 模擬含氮廢水配製與半導體廢水採集.....	17

3.2 分析方法與儀器	17
3.3 斑馬魚胚胎毒性試驗材料與方法	19
3.3.1 斑馬魚養殖	19
3.3.2 斑馬魚配對條件與方法	20
3.3.3 斑馬魚胚胎毒性試驗	21
3.3.4 斑馬魚試驗終點觀察	22
3.4 數據分析	23
第四章 結果與討論	24
4.1 斑馬魚胚胎暴露於模擬含氮廢水之毒性	24
4.1.1 斑馬魚胚胎之死亡率	24
4.1.2 斑馬魚胚胎之發育情形	29
4.2 斑馬魚胚胎暴露於半導體廢水之毒性	42
4.2.1 水質特性分析	42
4.2.2 斑馬魚胚胎之死亡率與發育情形	44
第五章 結論與建議	57
5.1 結論	57
5.2 建議	58
參考文獻	59

表目錄

表 2-1 斑馬魚胚胎毒性試驗之應用	15
表 3-1 各項終點觀測時間點	23
表 4-1 實廠廢水水質特性分析	43

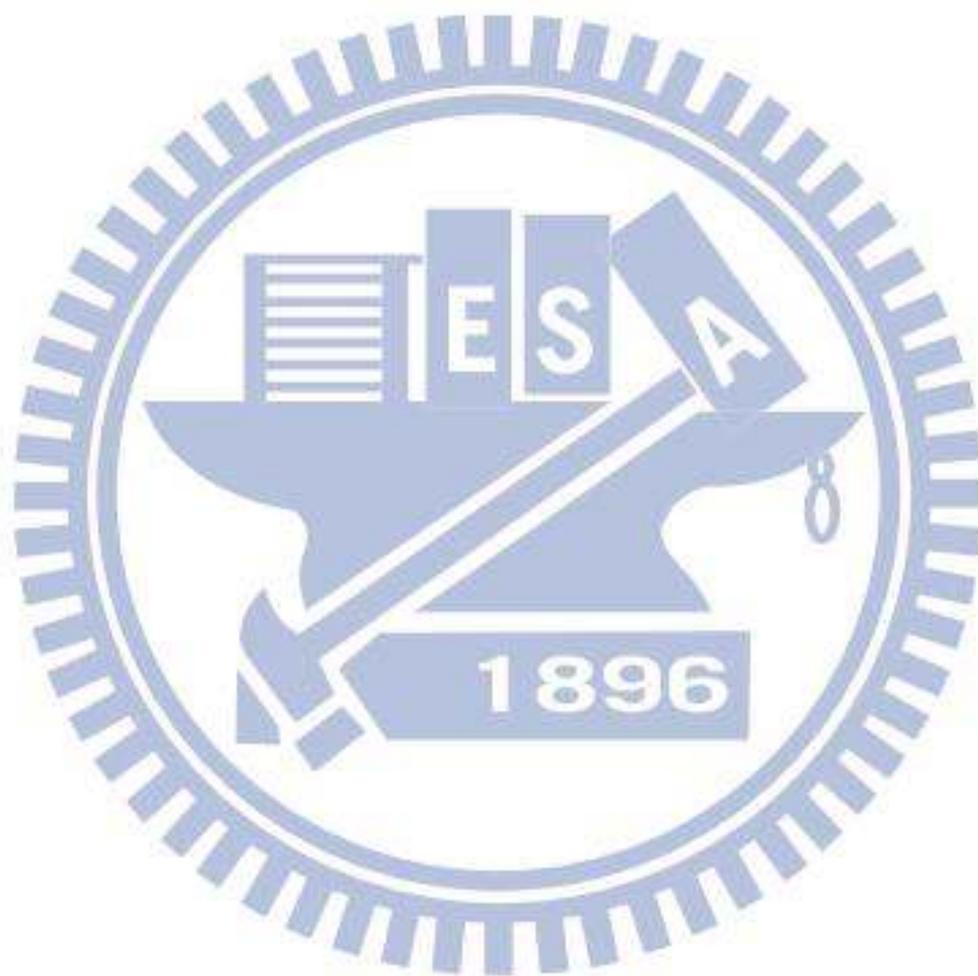


圖目錄

圖 1-1 研究架構	4
圖 2-1 雄雌斑馬魚之辨別	11
圖 2-2 斑馬魚胚胎各階段發育狀態	12
圖 2-3 斑馬魚各器官分布位置	13
圖 3-1 斑馬魚養殖循環系統	19
圖 3-2 幼魚體長量測範圍	23
圖 4-1 模擬含氮廢水對胚胎死亡率之影響	25
圖 4-2 模擬含氮廢水對胚胎累積孵化率之影響	30
圖 4-3 模擬含氮廢水對斑馬魚心跳次數之影響	33
圖 4-4 模擬含氮廢水對胚胎與幼魚外觀發育之影響	36
圖 4-5 模擬含氮廢水對幼魚產生之致畸率與畸形數量	37
圖 4-6 模擬含氮廢水對幼魚生長體長之影響	40
圖 4-7 不同稀釋倍數之 HF/CMP 製程混合廢水對斑馬魚胚胎死亡率之影響	45
圖 4-8 不同稀釋倍數之 HF/CMP 製程混合廢水對斑馬魚胚胎發育之影響	46
圖 4-9 不同稀釋倍數之製程酸鹼廢水對斑馬魚胚胎死亡率之影響	49
圖 4-10 不同稀釋倍數之製程酸鹼廢水對斑馬魚胚胎發育之影響	50

圖 4- 11 不同稀釋倍數之出流水對斑馬魚胚胎死亡率之影響 53

圖 4- 12 不同稀釋倍數之出流水對斑馬魚胚胎發育之影響 54



第一章 前言

1.1 研究背景

半導體產業在台發展已久，不但替台灣經濟帶來可觀的成長，亦帶來許多環境危害問題亟待處理。根據環保署調查，一個 12 吋晶圓廠每天就能排放出約 1 噸的廢水，且半導體產業製程繁複，會使用多樣化學品，導致產生之廢水成分複雜，製程廢水主要可分為氟系廢水、一般酸鹼無機廢水、有機廢水及化學研磨廢水等，其中又以酸鹼廢水水量最大，成分也最為複雜，廢水中含有大量陰陽離子、有機物質及氨氮等，廢水裡氨氮濃度高達 2000 mg/L (王, 2003)。然而濃度過高的有機氮及氨氮排放至環境水體後，除了本身具有的毒性，還可能轉變成硝酸鹽氮產生二次污染，這三者皆會造成水質惡化及水體優養化，甚至會危害到水中生物生存，可見含氮物質對生態可能造成的危害不容小覷。因此環保署已於 100 年 12 月 1 日訂定法規管制氨氮放流水，依據「晶圓製造及半導體製造業放流水標準」，既有事業氨氮管制採兩階段執行，第一階段限制值 75 mg/L，第二階段限制值 30 mg/L，而硝酸鹽氮原定的管制標準則為 50 mg/L，目前對有機氮，如氫氧化四甲基銨尚無法規管制(環保署, 2011)。

然而若僅以傳統水質標準來管制含氮放流水的排放，其流放至水體仍有可能對水生生物造成的潛在危害，因此為彌補水質化學分析測試上之不足，許多國家早已建立放流水生物毒性檢測方法瞭解放流水中的化學物質對生物的影響，如美國環保署的全放流水毒性測試方法(Whole effluent toxicity method, WET)，荷蘭的直接毒性評估(Direct toxicity assessment, DTA)，各國皆發展出各自的方法論(Tislera *et al.*, 2004; Naddy *et al.*, 2011)，我國也於 2005 年公告五種水樣急毒性檢測方法(水蚤、米蝦、羅漢魚、鯉魚及粗首鱲)(王, 2011)，開始對放流水急毒性進行規範。

但這些毒性檢測方法的判定終點大多以死亡率為標的(Wollenberger *et al.*, 2000)，如果毒性物質濃度太低，即無法在短時間看出毒性物質對生物的影響，因此目前國外

已有使用魚類胚胎進行毒性試驗的方法，在魚類胚胎生長的過程觀測不同的實驗終點如孵化速率、心跳與生長型態等，可避免多數生物測定方法在無效應濃度(No observed effect concentration, NOEC)或最低觀察濃度(Lowest observed effect concentration, LOEC)之下所遺漏之訊息。

斑馬魚的胚胎是進行胚胎毒性試驗合適的選擇，因其產卵量大與卵的體積小，可在小空間進行大量的樣本暴露^(OECD, 1992)，且胚胎有外觀透明、發育快速等優勢，96 小時身體結構即建立完成，使用顯微鏡便可觀察胚胎發育狀態^(Lawrence *et al.*, 2007)，加上斑馬魚的基因有 87% 與人體相似，研究所得之毒物資料對人體有很大的參考價值。德國也已在 2005 年提出標準化學會(Deutsches Institut für Normung, DIN)的標準規範，指出以斑馬魚胚胎進行毒性測試的便利性與利用價值，更欲將之應用在放流水排放規範中。斑馬魚胚胎近幾年常使用在環境毒物研究當中，利用魚類胚胎可評估工業排放廢水的生物毒性，還可觀察毒物對幼魚發育的影響^(Shi *et al.*, 2011)。因目前對斑馬魚胚胎暴露於半導體廢水的研究有限，本研究欲評估含氮物質對斑馬魚胚胎的生物毒性，找出不同含氮物質對胚胎發育的影響方式，並探討暴露於實廠廢水與模擬含氮廢水的胚胎毒性試驗結果之關聯性。

1.2 研究目的與內容

本研究欲先探討模擬含氮廢水對斑馬魚胚胎存活率的影響，以及胚胎發育過程是否有延遲發育、生理機能衰退或畸形發育等現象，再取半導體廢水進行胚胎毒性測試，觀察經實廠廢水暴露的胚胎其生長發育與模擬含氮廢水毒性試驗結果之間的關聯性。

本研究內容包括：

- (1) 利用斑馬魚胚胎毒性試驗找出模擬含氮廢水對胚胎的半數致死濃度(LC₅₀)及最低效應濃度(LOEC)。
- (2) 探討斑馬魚胚胎暴露於模擬含氮廢水，對胚胎有無延遲發育、生理機能衰退以及產生畸形發育的現象，並觀察其畸形表現型態。
- (3) 探討斑馬魚胚胎暴露於半導體廢水，其胚胎存活率與幼魚發育情形，並與模擬含氮廢水暴露結果比較找出其關聯性。

1.3 研究架構

本研究欲使用斑馬魚胚胎評估模擬含氮廢水與半導體廢水之生物毒性。實驗分成兩部分，如圖 1-1 所示，首先利用斑馬魚胚胎暴露於模擬含氮廢水，觀察胚胎死亡率以及各項終點項目，如累積孵化率、體長、心跳次數與致畸率，瞭解含氮物質對胚胎產生影響的部位；另採半導體廢水，對廢水水質特性進行分析，並觀察經半導體廢水暴露的斑馬魚胚胎其死亡率與各項終點項目的發育情形。觀察所得的結果再使用 SPSS 統計軟體，分析各個暴露濃度的終點項目其顯著性，並找出斑馬魚胚胎暴露於模擬含氮廢水與半導體廢水間之關聯性。

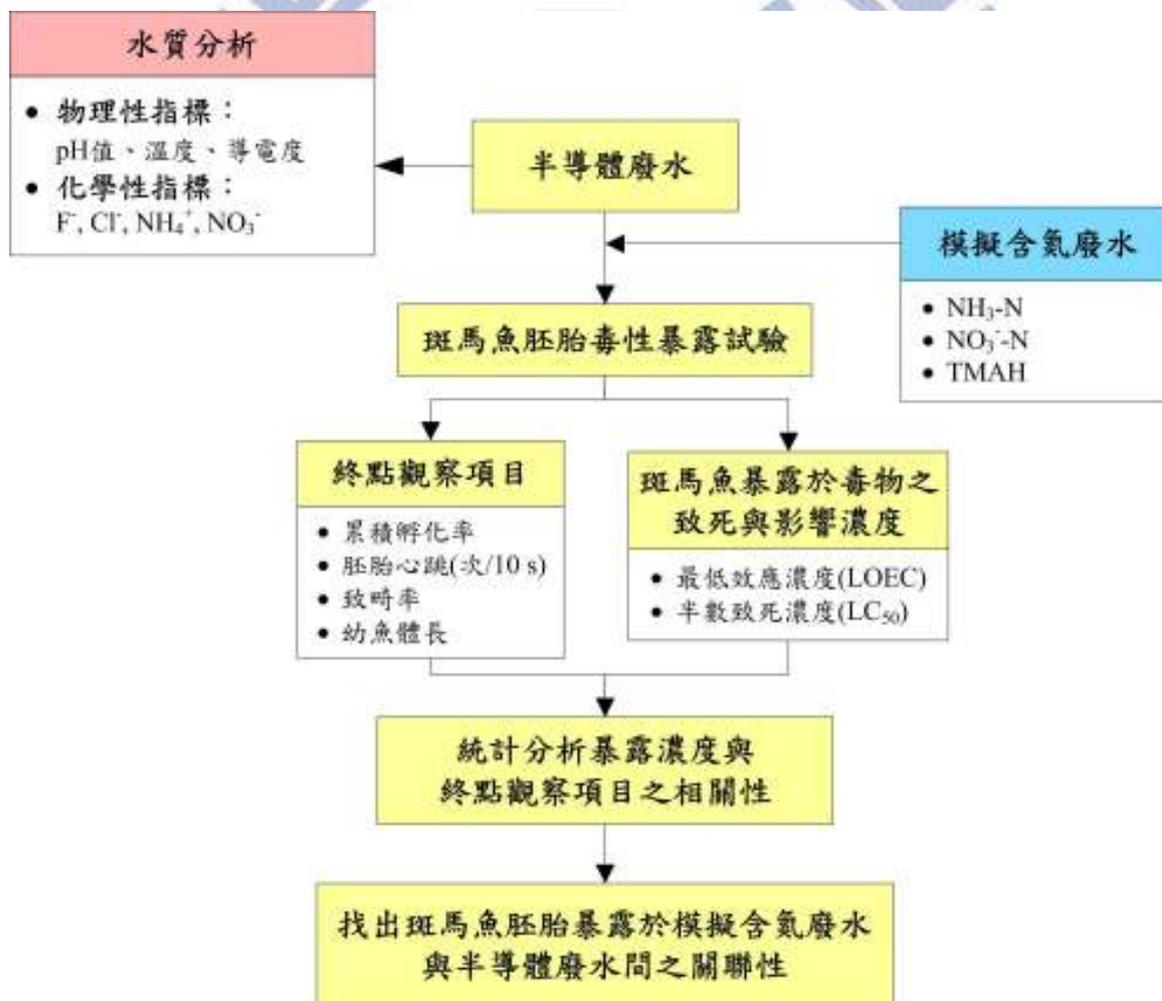


圖 1-1 研究架構

第二章 文獻回顧

2.1 半導體廢水種類與特性

半導體產業之範圍包括積體電路(Integrated circuit, IC)、分離式元件(Discrete devices)及光電元件(Optoelectronic devices)，而在半導體製造亦即晶圓加工(Wafer fabrication)是資金與技術最為密集之處，其上游產業包括產品設計、晶圓製造以及光罩製造等，下游產業則更為龐大，其中包括半導體後段製程的 IC 封裝、測試、包裝，以及週邊的導線架製造、連接器製造與電路板製造等，製作過程步驟多且繁複，且製程原料大多具有毒性，對於環境生態具有相當大的影響，包括廢水排放、廢氣排放、事業廢棄物處置及有毒化學物質等幾個部分，需特別注意並加以防範與控制^(陳, 2007)。

在半導體製造業所產生的廢水種類大致可分為酸鹼廢水、氟系廢水與化學研磨廢水。酸鹼廢水主要是集結製程系統中所使用的一些強酸、鹼與去離子水，以及濕式洗滌法過程中所使用的酸鹼氣體排放所產生；氟系廢水主要是製程中所使用到的高濃度氫氟酸，通常氟系廢水中的氟離子含量範圍在 500~3000 mg/L，為此股廢水中很高濃度的污染物，目前雖也會使用添加氨水的氫氟酸來取代高濃度的氫氟酸，但氨水中的銨離子卻有可能再跟廢水中的氟離子產生氟化氨污染物；化學機械研磨是半導體產業必備的一項製程，目的是為將晶圓拋光，製程會使用到大量研磨液，以免薄膜沉積時可能不均勻影響晶圓品質，因此研磨廢水會含有大量的微粒，以及研磨液中的 pH 緩衝劑與氧化劑皆為強鹼的液體，因此所產生的廢水也具有高污染性^(周, 2010)。

2.2 半導體製程廢水之含氮來源

半導體產業在台灣為重要的經濟指標之一，可是產業蓬勃發展往往會伴隨大量廢水的產生，而廢水污染源皆依製造作業各有不同，在所有製程中晶圓清洗是很重要的程序，為移除晶圓製程中產生的殘留物與控制表面之化學性生成超薄氧化物，每一道晶圓製程步驟之後以及每一道製程操作之前都必須做晶圓清洗，這也使清洗成為 IC 製程中重複使用頻率最高的步驟。

一般典型濕式的清洗 RCA 流程會使用多種清洗劑，RCA standard clean 1 (又稱 APM; $\text{NH}_4\text{OH}+\text{H}_2\text{O}_2+\text{H}_2\text{O}$) 為流程裡的其中一種，此清洗劑可移除表面微粒子、有機及部分金屬污染物，並同時進行氧化及蝕刻增加晶圓表面粗糙度。此外，氧化膜濕式蝕刻會使用經稀釋的氫氟酸清洗，目前亦有使用緩衝式氧化物蝕刻劑(又稱 BOE 或 BHF; $\text{NH}_4\text{F}/\text{HF}/\text{H}_2\text{O}$)，可用於取代蝕刻製程中的稀釋氫氟酸，以清除矽晶圓表面自然生成之二氧化矽層，不過用此清洗劑在蝕刻接觸的過程會產生 NH_4F 析出物產生污染^(Kern, 1990)。而近期科技廠常使用氫氧化四甲基銨(TMAH)，主要在玻璃基板時的光顯影製程中做為顯影劑之用，又因其為極強的鹼性溶液(pH 值高達 13 以上)，亦拿來作為清潔晶圓之溶劑使用^(Huynh *et al.*, 1998)。

2.2.1 含氮物質對生態環境的危害

清洗過程中使用到的氨水、氟化氨與氫氧化四甲基銨三種含氮化合物，排放至水體不僅會產生污染，亦有文獻指出會對水中生物產生不同程度的生物毒性 (Weinstein and Kimmel, 1998; Lemarie *et al.*, 2004)，如能利用胚胎毒性暴露試驗找出含氮物質對胚胎早期發育影響的部位，即可瞭解暴露低濃度的含氮化合物對生物的潛在危害。

(1) 氨氮

因氨氮為高需氧量物質，流入水體會破壞水域之氧平衡，且氨氮為水體植物及藻類之營養成分，但過多的氨氮會加速河川湖泊之優養化。對大部分的水生生物而言，氨氮為有毒物質，必須有效減少水中之溶解氨，才可使水生生物生活的環境不受影響。如短溝對蝦暴露在不同溫度的氨氮溶液中 96 小時，26°C 的 LC₅₀ 值為 1.00 mg NH₃-N/L。在多齒新米蝦慢毒試驗中，總氨濃度大於 1.14 mg N/L 的環境下蝦隻成長情形較差，且母蝦的抱卵率、孵出的蝦苗數量以及公蝦的雄性生殖器指數皆會下降，其對總氨的最大容許濃度為 0.38~1.14 mg N/L^(陳, 2007)。氨氮不僅對食物鏈底端藻類有影響，甚至魚類也無法負荷過高的濃度，如銀鱗鯧的建議養殖安全值也僅有 0.089 mg NH₃-N/L^(李, 2011)。由此可見氨氮對水中生物的毒性影響很大，在低濃度的條件下也可能因為長期暴露而導致死亡^(Kir *et al.*, 2004)。

(2) 硝酸鹽氮

硝酸鹽氮是含氮有機物氧化分解的最終產物，雖然在水中毒性比氨氮和亞硝酸鹽氮低，依然有很多研究顯示硝酸鹽氮對水中生物有毒性，Camargo (2005)指出硝酸鹽氮對生物的毒性反應，主要是由於硝酸鹽氮會氧化血液中的血紅蛋白，使得生物失去氧氣攜帶的能力導致慢性中毒，進而擾亂生物的滲透調節造成生物死亡。由於農業與工業用水的排放，水體中大多存在不同濃度的硝酸鹽氮，因此亦有許多研究關於水體生物暴露於硝酸鹽氮的毒性，Scott and Crunkilton (2000)使用水蚤暴露於硝酸鹽，其 48 小時的 LC_{50} 為 $462 \text{ mg NO}_3^- \text{-N/L}$ ，但不同物種對硝酸鹽氮的耐受度皆不同，如 Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) 暴露於硝酸鹽氮的 LC_{50} 為 1028 mg/L (Hamlin *et al.*, 2006) 即比水蚤的毒性低。因此有些研究不單只探討硝酸鹽氮對生物的致死率，從不同的亞致死劑量可發現即使生物未死亡依然會有其他生理與生長上的影響，Chambers (2001) 發現暴露於低濃度的硝酸鹽，約 $1\sim 5 \text{ mg NO}_3^- \text{-N/L}$ 即會提高銀鮭魚 (*Oncorhynchus kisutch*) 與彩虹鱒 (*Oncorhynchus mykiss*) 胚胎的死亡率，且還會減緩胚胎生長的速度。

(3) 氫氧化四甲基銨 (Tetramethylammonium hydroxide, TMAH)

氫氧化四甲基銨 (TMAH) 現今已被半導體與光電產業廣泛使用作為顯影劑或蝕刻劑 (Chang *et al.*, 2008)，但因 TMAH 為具有毒性與腐蝕性的強鹼溶液，過度暴露於 TMAH 會對人體產生傷害，過去幾年間已發生多起勞工因接觸過量的 TMAH 而致死的案例 (Wu *et al.*, 2008)，因此 TMAH 的毒性很受到重視。目前已有對大鼠進行 TMAH 毒性暴露測試，當大鼠暴露 2.38% 與 25% 的 TMAH，其 4 小時的 LD_{50} 分別為 85.9 mg/kg 與 28.7 mg/kg ，且發現暴露後的大鼠有支氣管病變、泌尿系統失禁等現象，TMAH 亦會經由皮膚吸收導致呼吸抑制更嚴重會猝死 (Lee *et al.*, 2011)，對生物來說暴露後反應快速且毒性很高。

2.3 生物毒性檢測

2.3.1 生物毒性測試方法

台灣人口成長與產業發展迅速，不過對於環境保護與規劃的法規仍尚未健全，致使環境污染負荷日益加重，加上廢污水排放至水體後成分極為複雜，在檢驗分析水中污染物時，往往無法檢測出水中全部的毒性物質，因此除了要考慮傳統水質參數之外，更須考量有害物質或毒性污染物質對人體健康及生態環境產生的影響。為解決此一問題，環境科學家乃建議發展以生物為指標之毒性試驗(Bioassay)，用以輔助化學檢測能力之不足，並作為放流水中毒性物質之管制基準(Smolders *et al.*, 2002; Marugán *et al.*, 2012)。

一般毒性試驗可分為急毒性(Acute toxicity)與慢毒性(Chronic toxicity)檢測，短期暴露(96 小時以內)於某一物質，所引起受測生物之致死反應為急毒性，可用來觀察個體死亡或活動受抑制等立即性的影響，依 American Public Health Association (APHA)的建議，急毒性試驗的結果可以半數致死濃度(50% Lethal concentration, LC₅₀)來表示。而慢毒性為生物長時間暴露於測試環境中(一個星期以上)，可觀察其死亡數量、活動情形，甚至可瞭解生物孵育後代的能力有無受損，還有致畸胎與遺傳因子突變等影響。而目前水環境之生物毒性測試已有針對急毒性、慢毒性等訂定不同之測試方法，及選定不同之測試生物，可依試驗者想獲得的資訊，選擇不同的生物毒性檢測方法(Mishra *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2004)。

不過上述用來檢測急毒性或慢毒性所使用的生物如水蚤、彩虹鱒與鯉魚等，皆有其試驗上的缺點，水蚤為無脊椎動物且構造簡單，通常只能以死亡率作為毒性試驗結果的判斷，對於暴露後生長的變化所能獲得的資訊較少。而以魚類作為毒性測試生物，試驗的成魚需有一定時間的馴養，加上試驗暴露溶液的體積較大，無法短時間進行大量樣品暴露，暴露後對魚體的分析不易，且還會有大量廢棄物產生，這些都是傳統生物毒性檢測所會遇到的問題。近年來許多研究開始使用魚

類胚胎替代傳統毒性檢測的生物，如斑馬魚與青鱗魚皆是良好的胚胎孵育魚種，其中又以斑馬魚胚胎最為廣泛應用，因其繁殖力強，產出的胚胎量大且體積又小，可大量進行毒物暴露，加上胚胎外觀透明，利於在暴露期間使用顯微鏡觀察胚胎發育的完整型態變化，相較於傳統的急、慢毒性檢測方法，能夠在短時間暴露後獲得更多的訊息 (Wedekind *et al.*, 2007; Lammer *et al.*, 2009; Embry *et al.*, 2010)。

2.3.2 斑馬魚繁殖行為與胚胎發育特性

(1) 斑馬魚種類及繁殖行為

斑馬魚(*Danio rerio*)源自印度東部加爾各答至馬蘇利帕達坦等水域，分類下屬於輻鰭魚綱(*Actinopterygii*)、鯉形目(*Cyprinidae*)、鯉科(*Cypriniformes*)、魚丹屬(*Danio*)，主要分布於孟加拉、印度、巴基斯坦、緬甸、尼泊爾溪流，體色為銀色或金色。本實驗所採用魚種為野生型斑馬魚，帶有一些藍色或紫色橫紋，雄魚比雌魚長，由於斑馬魚體型略小，即使發育成熟的斑馬魚體長只有 3~4 公分，最大約 5 公分(圖 2-1)，飼養上較為便利，目前已被許多科學研究用以做為模式物種，例如發育生物學、基因體學、神經生物學等領域上，應用非常廣泛。

斑馬魚為廣溫性魚類，可生活於 22~28°C 水溫之中，成長至性成熟階段約三至四個月即可進行繁殖，無繁殖季之分。斑馬魚配對繁殖主要利用光源的控制，在繁殖之前置於暗室 10 小時，開燈後便會開始追尾產卵，可隨時配合實驗上的需要進行配對，在實驗室中也易於馴養，且斑馬魚屬於單尾多產，平均每次一對雄、雌魚產卵量可達 200~300 顆卵，每隔一至兩週便可配對產卵，是繁殖力非常好的魚種 (Lawrence *et al.*, 2007; 龍, 2011)。

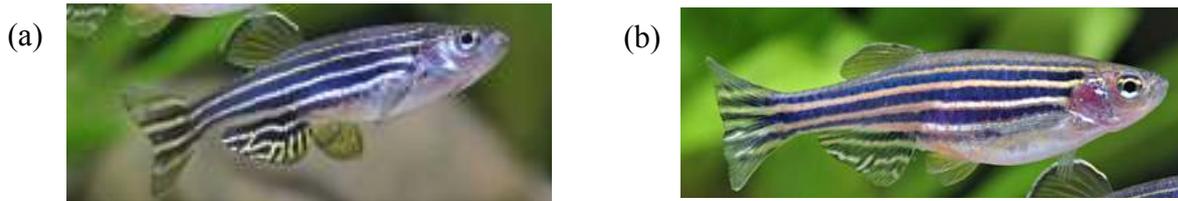


圖 2-1 雄雌斑馬魚之辨別

(a)雄性、(b)雌性

(2) 胚胎特性與發育情形

斑馬魚產出胚胎為沉性卵，不附著於缸壁也不易黏聚在一起，方便實驗使用上之取用，此外，因胚胎透明且體積小，易於進行外部型態發育及觀察，加上胚胎發育迅速，在受精後 24 小時內身體架構已建立，大部分內臟器官都在 96 小時內發育完成，因此深受毒理學、動物行為及魚類生理學學者喜愛。

文獻指出硬骨魚類於胚胎及幼魚時期在生命週期中是較為敏感的階段，因胚胎發育時細胞、組織及器官發育容易受外界環境之影響，而導致生長的外觀型態改變，因此透過觀察胚胎的孵化過程，更能準確的評估污染物對生物發育所產生的干擾^(Wedekind *et al.*, 2007; Lammer *et al.*, 2009)。以下是胚胎生長的七個時期^(OECD, 1992; Yang *et al.*, 2009)：

- (1) 受精卵時期(Zygote period, 0~0.75 hpf)：精子與卵子結合後，細胞開始分裂(圖 2-2 (a, b))。
- (2) 細胞分裂時期(Cleavage period, 0.75~2.25 hpf)：細胞持續分裂，直到分裂出一定數量的細胞(圖 2-2 (c, d))。
- (3) 囊胚期(Blastula period, 2.25~5.25 hpf)：在分裂第 14 次後進入囊胚期，至開始形成原腸。
- (4) 外包期(Epiboly, 4.7~10 hpf)：細胞藉由細胞骨架的幫助，一邊分裂一邊漸漸從動物極(Animal pole)往植物極(Vegetal pole)的過程；這個階段可以幫助我們很清楚的觀察到胚胎早期細胞移動的速度(圖 2-2 (e, f))。
- (5) 原腸期(Gastula period, 5.25~10 hpf)：細胞會移動摺疊，形成三個胚層：外胚

層、中胚層、內胚層(圖 2-2 (g))。

(6) 體節形成期(Segmentation period, 10~24 hpf)：各種器官、體節形成，但尚未發育完成(圖 2-2 (h, i))。

(7) 正常在 48~72 hpf 之間會孵化為斑馬魚幼魚(圖 2-2 (j))。

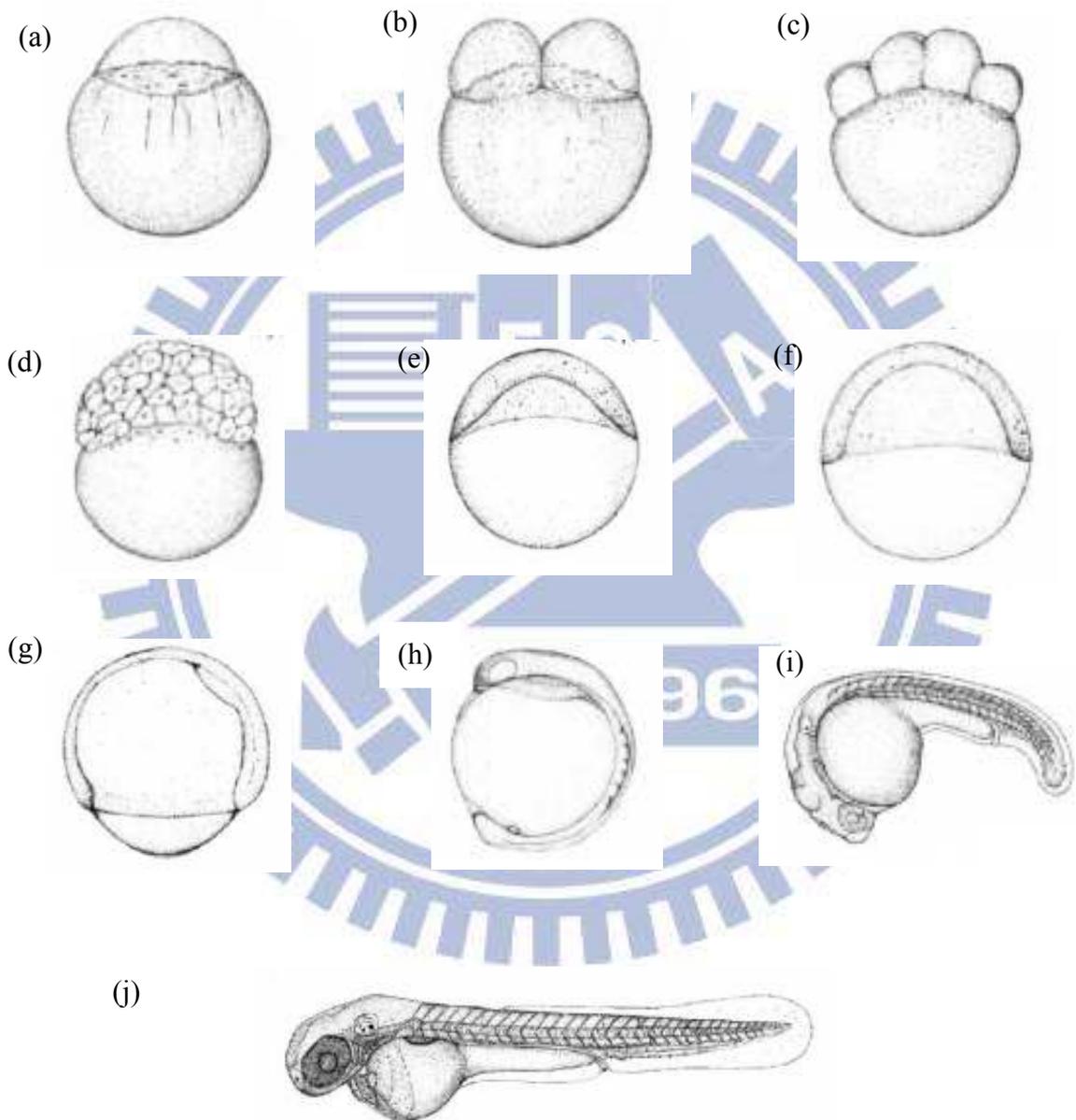


圖 2-2 斑馬魚胚胎各階段發育狀態 (Yang *et al.*, 2009)

(a) 0.2 hpf, (b) 0.75 hpf, (c) 1.25 hpf, (d) 2.25 hpf, (e) 4.7 hpf, (f) 5.3 hpf, (g) 10 hpf, (h) 12 hpf, (i) 22 hpf, (j) 48 hpf (hpf, hours-post fertilization)

此外胚胎試驗可提供更多易於量化之觀測項目，如孵化時間、心跳、體長、畸形發育及幼魚的行為觀察，並可從選擇分析之項目得知不同組織間的生物損傷，如肌肉神經、生理或行為及型態發育之受損。以下為各部位器官架構建立及發育完全所需的時間，可藉由這些資訊挑選合適的觀測終點，而圖 2-3 為各個目標器官在魚體的分布位置^(Esch et al., 2012)。

- (1) 運動系統：24 小時開始有自發運動，68 小時身體已可快速游動。
- (2) 心臟系統：24 小時心室心房構造建立，60 小時 S 形 looped 形成，72 小時離子通道建立完成。
- (3) 神經系統：48 小時腦部神經已建立，10 天已有腦部血液屏障。
- (4) 視覺系統：10 小時可在顯微鏡下觀察到眼睛形成，68 小時對光線有反應，且身體已可快速移動，5 天後視覺系統才發育完全。
- (5) 肝臟系統：60~70 小時構造建立完成，5 天時肝臟發育完全且有運作功能。
- (6) 腸道系統：36 小時開始發展，5 天後才可以消化攝食的飼料。
- (7) 腎臟系統：40 小時有過濾血液的功能，12 天後中腎發育完成。

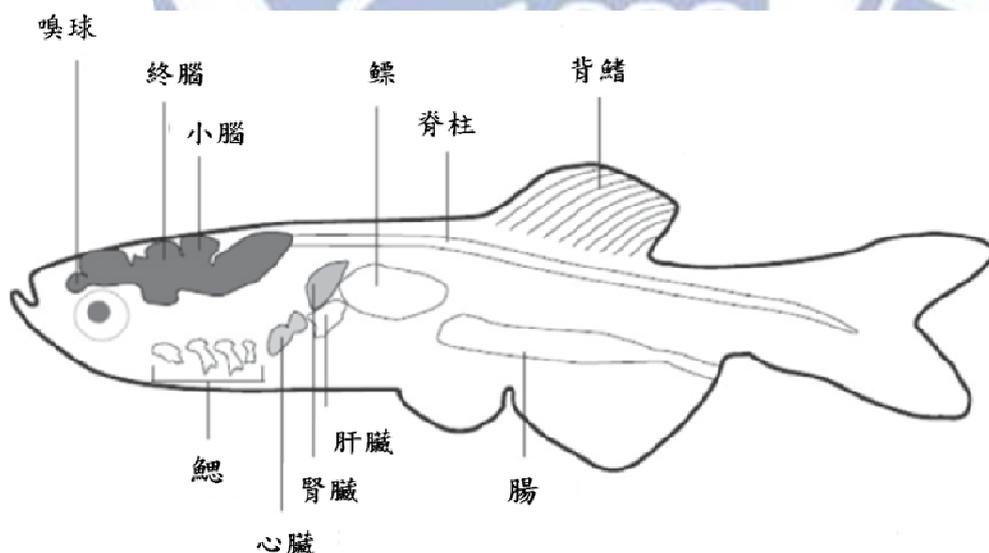


圖 2-3 斑馬魚各器官分布位置^(Esch et al., 2012)

2.3.3 斑馬魚胚胎毒性試驗之應用

斑馬魚胚胎毒性試驗除了可觀察暴露毒性物質後胚胎的死亡率，最重要的是可以知道尚未死亡的胚胎發育成幼魚後，形體與行為上有沒有受到毒性物質的干擾，亦可幫助我們了解這些毒性物質會影響生物的部位，目前已有許多研究用斑馬魚胚胎評估水域環境受污染的風險(Scholz *et al.*, 2008)，以及用來檢驗化學物質或藥物可能對胚胎產生的致畸性(Serbedzija *et al.*, 1999; Selderslaghs *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009)。

斑馬魚胚胎毒性試驗應用範圍廣泛，可用來評估觀察奈米金屬、有機物質、精神病藥物與出流水的毒性，如表 2-1 所示。Garci'a-Cambero (2012)使用斑馬魚胚胎評估含有精神科藥物的西班牙河水，偵測結果顯示胚胎經河水暴露後並沒有嚴重的死亡及畸形的情形，不過卻發現對 6 天大的幼魚進行神經反應測試時，有行為反應力下降的現象，此結果顯示經河水暴露後的幼魚，其神經系統有受到河水中毒性物質影響而降低行為靈敏度。而 Jiang (2013)亦使用胚胎來檢驗經六價鐵化合物處理的藥廠廢水其生物毒性，並得證處理後的出流水不會使胚胎死亡，在孵化率與致畸率也下降至安全範圍。胚胎毒性試驗除了可以獲得觀察死亡率所無法得知的訊息外，還可以評估出流水流放至水體的安全性。

表 2-1 斑馬魚胚胎毒性試驗之應用

毒性物質	觀測終點	實驗結果	文獻
奈米銀顆粒	(1) 死亡率 (2) 孵化率 (3) 心包膜水腫 (4) 心跳次數 (5) 細胞凋亡	(1) LC ₅₀ ：介於 25~50 µg/L。 (2) 在 24 小時發現心包膜腫大的現象，到 72 小時此現象變得更加顯著。 (3) 72 小時尚未有胚胎孵化，有延遲孵化的現象。 (4) 當暴露濃度為濃度 50 µg/ml 時，心跳明顯減緩為 39 次/分(控制組 150 下/分)，且還有 60~90%的幼魚在頭部與尾巴出現身體變形。	(Asharani <i>et al.</i> , 2008)
六溴環十二烷 (HBCD)	(1) 死亡率 (2) 孵化率 (3) 心跳 (4) 畸形率 (5) 生長體長 (6) 細胞凋亡 (AO 染色、ROS 量測)	(1) 在濃度 1.0 mg/L 時只有 79.2%的孵化率(控制組 90%)。 (2) 與控制組相比，所有暴露濃度的心跳皆有顯著降低。 (3) 當濃度 0.05 mg/L 以上，其體長生長都有抑制現象。 (4) 有脊椎彎曲、外包畸形、卵黃囊和心包膜水腫，尾巴跟心臟畸形，魚鰓無法膨脹等畸形發育情形。 (5) AO 染色發現幼魚眼睛與腦部細胞凋亡的情形較為嚴重，且隨濃度增加，ROS 量測的 caspase-3 與 caspase-9 含量愈高。	(Deng <i>et al.</i> , 2009)

表 2-1 斑馬魚胚胎毒性試驗之應用(續)

毒性物質	觀測終點	實驗結果	文獻
三種有機溶劑 (ETOH、 DMSO、 Acetone)	(1) 死亡率 (2) 累積孵化率 (3) 心跳 (4) 畸形率	(1) 三種有機溶劑以乙醇的毒性較高，但也要濃度高於 1% 才有顯著的胚胎死亡率。 (2) 當乙醇濃度為 1% 時即會降低胚胎累積孵化率，且有較高(30%)的畸形發育現象。 (3) 三種有機溶劑濃度大於 1.5% 時，皆會降低胚胎心跳速率。	(Hallare <i>et al.</i> , 2006)
西班牙河水 (含精神科藥 物)	(1) 胚胎死亡率 (2) 孵化率 (3) 48 小時心跳次數 (4) 尾部彎曲(往外彎或向內彎) (5) 自發運動與行為模式	(1) 西班牙河水不會造成胚胎死亡，亦沒有出現嚴重的畸形發育現象。 (2) 對 6 天大的幼魚進行神經反應測試時，有行為反應力下降的現象，顯示河水中毒性物質會降低斑馬魚幼魚行為靈敏度。	(García-Camero <i>et al.</i> , 2012)
製藥廠廢水	(1) 死亡率 (2) 孵化率 (3) 畸形發育	(1) 未經處理的藥廠廢水雖無造成胚胎死亡，但在 72 小時有 8.3% 的胚胎孵化(控制組有 90%)，且有身體變形、卵黃囊、心包膜腫大等現象。 (2) 經六價鐵化合物處理過的藥廠廢水，在死亡率、孵化率與畸形發育皆不受影響。	(Jiang <i>et al.</i> , 2013)

第三章 實驗材料與方法

3.1 模擬含氮廢水配製與半導體廢水採集

(1) 模擬含氮廢水配製

本實驗以氯化銨、硝酸鈉與氫氧化四甲基銨分別作為氨氮、硝酸鹽氮及有機氮的代表化合物，每種化合物分別配製 5 個濃度進行斑馬魚胚胎毒性試驗。氯化銨(Panreac, 99.5%)配製濃度為 200~600 mg/L (氨氮濃度為 50~155 mg/L)；硝酸鈉(SIGMA-Aldrich, 99.5%)配製濃度為 6000~10000 mg/L (硝酸鹽氮濃度為 990~1650 mg/L)；氫氧化四甲基銨(Alfa Aesar, 25% in water)配製濃度為 200~600 mg/L (總氮濃度為 30~90 mg/L)。

(2) 半導體廢水採集

半導體廠之代表性廢水為氟系廢水、化學研磨製程廢水、製程酸鹼廢水與處理過之出流水，此處取這幾股廢水進行斑馬魚胚胎毒性評估。但因此公司廢水處理流程之緣由，氟系與化學研磨廢水為混合成一股之廢水。因此本實驗所取半導體廢水總共有三股，分別為氟系與化學研磨製程廢水、製程酸鹼廢水與出流水。

3.2 分析方法與儀器

(1) 化學需氧量

化學需氧量(Chemical Oxygen Demand, COD)的檢測採用環檢所公告之重鉻酸鉀迴流法(NIEA W515.54A)，加入過量重鉻酸鉀溶液以氧化水中有機物質，在約 50%硫酸溶液中迴流 2 小時，以硫酸亞鐵銨溶液滴定剩餘之重鉻酸鉀，藉由消耗之重鉻酸鉀量，即可求得水樣中化學需氧量，此可得知樣品中被氧化有機物的含量。

(2) pH 值及導電度

使用的 pH meter 型號為 Mettler Toledo FEP20 FiveEasy Plus，每次使用前使用酸鹼標準液(pH 為 4.0、7.0 及 10.0，25°C)及儀器內建的 RSY 模式進行校正；導電度計型號為 CLEAN CON 200 CON/TEMP。

(3) 離子層析儀(Ion chromatography, IC)

為偵測水樣中陰(陽)離子之濃度，在此使用型號為 Dionex ICS-1000 的離子層析儀進行分析，分析前待測水樣需經 0.45 μm 濾紙過濾，當待測溶液隨特定流洗液流經一系列離子交換層析管柱時，即因其與低容量之強鹼性交換樹脂間親和力不同而被分離。分離後待測陰(陽)離子再流經一高容量陽(陰)離子交換樹脂之抑制裝置，而被轉換成具有高導電度酸之型態，流洗液則轉換成低導電度之碳酸。經轉換後之待測陰(陽)離子再流經適當之偵測器，即可依其滯留時間及波峰面積予以定性及定量。

(4) 總有機碳分析儀(Total organic carbon analyzer, TOC)

此處使用日本 Shimadzu 公司製造，型號 ASI-L 之總有機碳分析儀，偵測方法為非分散型紅外線測定方法，用以測定水樣中之 DOC 濃度。首先取適量水樣經 0.45 μm 濾紙過濾後，利用 HCl 酸化使其 pH 值小於 2，再以高純度氮氣曝氣 12~15 分鐘用以去除水樣中無機碳類，水樣經配有自動吸取裝置之高溫氧化法總有機碳偵測儀器吸入後，經高感度觸媒於 680°C 高溫下氧化水樣，使其中總有機碳成份轉換成 CO_2 流經反應器及除濕氣冷卻並乾燥後，進入偵測器分析 CO_2 濃度，所得濃度即為 DOC 的濃度。

(5) 顯微鏡

本實驗使用正立干涉位相差顯微鏡(型號為 ZIESS Imager. A2)觀察斑馬魚胚胎的存活狀態及幼魚發育的形體，並用即時影像拍下斑馬魚胚胎與幼魚的照片。

3.3 斑馬魚胚胎毒性試驗材料與方法

3.3.1 斑馬魚養殖

本實驗動物採用市售野生型(wild-type)斑馬魚，購入後置於魚類養殖循環系統進行馴養，如圖 3-1 所示。放置魚苗於系統前，循環養殖系統的溫度設定在 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，需先將系統裡的水曝氣一日以上，去除水中餘氯與增加溶氧，且等到原本運送時裝魚苗的水與系統的水溫調整一致後即可放入系統，馴養時依照性別分開飼養於缸中，以便配對時取用。斑馬魚光週期為 14：10 小時(光：暗)，以市售斑馬魚成魚飼料(成分：粗蛋白質 46.8%以上，脂肪 5.2%以上)每日餵食兩次，於實驗前三天另以乾燥豐年蝦餵食種魚補充養分。斑馬魚養殖水使用後會經由管線流至系統下方的過濾硝化系統進行處理，處理完迴流至養殖魚缸前還有紫外線進行殺菌，系統循環用水每個月會換水一次，以保持水質品質。



圖 3-1 斑馬魚養殖循環系統

3.3.2 斑馬魚配對條件與方法

(1) 挑選種魚

雄魚：性成熟前後外觀變化不大，保持原本的流線型，臀鰭較母魚長。在身上各個魚鰭末端，時常可看到有明顯的黃色出現。

雌魚：性成熟後肚子開始膨大，裡面卵囊形成卵，臀鰭較公魚來得小、短且較圓，魚鰭末端有時也有黃色出現，但相對於公魚出現的時間比較少。

(2) 多對配對：斑馬魚在一定空間內可做多對配對，放置種魚於配對缸的數量不宜超過10隻，比例以雄魚：雌魚為 $(n+1):n$ 較佳。

(3) 配對環境：水溫維持在 $26\sim 28.5^{\circ}\text{C}$ 之間，光暗週期調控為14：10小時。

(4) 交配情形：經過10小時的暗室環境，斑馬魚在光照後會分泌費洛蒙，雄魚便會往雌魚方向前去追尾進行交配。



3.3.3 斑馬魚胚胎毒性試驗

(1) 毒性暴露之胚胎採集

- a. 經過暗室 10 小時的斑馬魚，光照後待種魚產卵，選取產出 1 小時內的受精卵進行胚胎試驗。
- b. 挑出受精卵至稀釋水(5.0 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂ · 2H₂O, 0.33 mM MgSO₄ · 7H₂O)中，並滴入 2~3 滴 0.1 mg/L 的甲基藍溶液殺菌。
- c. 將受精卵放置於顯微鏡下，挑選無死亡或變形的胚胎進行毒性試驗。

(2) 待測溶液

- a. 模擬含氮溶液：以氯化銨、硝酸鈉與氫氧化四甲基銨三種化合物，分別配製代表氨氮、硝酸鹽氮與有機氮的模擬含氮廢水。
- b. 半導體廢水：取自某半導體廠之三股廢水，分別為氟系與化學研磨製程廢水(HF/CMP)、製程酸鹼廢水與經處理過之出流水。

(3) 胚胎毒性暴露

- a. 每次進行胚胎毒性暴露皆須同時做控制組，確保每次實驗的品質。控制組取配置好的濃縮儲備溶液，使用前需先稀釋 50 倍，暴露組依每次實驗內容稀釋不同倍數，每組暴露濃度皆 3 重覆。
- b. 配製好的暴露溶液需調整 pH 值至 7.5±0.1。
- c. 調整完 pH 值的暴露溶液，放入挑選過的斑馬魚胚胎，靜置 2 小時後即可將斑馬魚胚胎移入塑膠 96 孔盤，每一個孔盤只放置一顆斑馬魚胚胎。
- d. 維持毒性暴露環境溫度於 27~28.5°C。
- e. 暴露觀察時間：24、48、60、72 及 96 小時。

3.3.4 斑馬魚試驗終點觀察

使用受精後 1 小時(hours post fertilization)內的斑馬魚胚胎暴露於控制組及不同濃度的含氮物質，除了觀察胚胎的死亡情形，並於不同的時間點對斑馬魚胚胎的孵化情形、心跳速率、胚胎體長與畸形型態進行觀察並記錄。

如表 3-1 所示，每一個觀測的時間點皆會記錄胚胎的死亡情形，並以公式(1)計算得到胚胎的死亡率，不過本實驗只針對 48 及 96 小時的胚胎死亡率進行探討。在暴露後 48、60、72 與 96 小時還會觀察胚胎孵化個數，依據記錄的結果計算上述不同時間點的累積孵化率(如公式 2 所示)。此處亦有觀察胚胎心跳速率，觀測時間為 48 跟 96 小時，計算心跳前需先將胚胎置於室溫條件 10 分鐘，待胚胎以穩定的心跳速率跳動再進行計算，每次心跳次數計量採隨機取樣 10 隻斑馬魚胚胎，並計算其 10 秒的心跳次數，量測結束再以 Excel 計算平均值。最後的暴露觀測時間點為 96 小時，此時需觀察幼魚發育有無異常的型態，如脊椎彎曲、心包膜腫大與卵黃囊腫大的現象，記錄其數量與類型並使用公式(3)計算其致畸率。最後一項觀測項目為量測胚胎體長，此處同樣隨機取樣 10 隻幼魚量測其生長體長，量測距離如圖 3-2 所示，從頭部頂端量至最後一節體節，量測完以 Excel 計算平均值。

$$\text{死亡率(\%)} = \frac{(\text{暴露胚胎總數} - \text{胚胎存活個數})}{\text{暴露胚胎總數}} \quad (1)$$

$$\text{累積孵化率(\%)} = \frac{\text{胚胎累積孵化個數}}{\text{暴露胚胎總數}} \quad (2)$$

$$\text{畸形率(\%)} = \frac{\text{已孵化胚胎之畸形個數}}{\text{存活幼魚個數}} \quad (3)$$

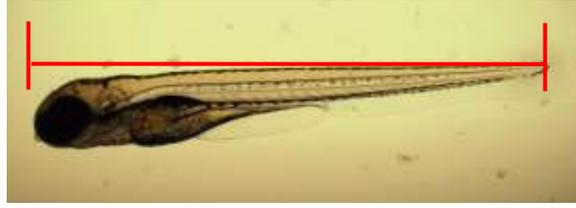


圖 3-2 幼魚體長量測範圍

表 3-1 各項終點觀測時間點

觀測終點	觀測時間(小時)				
	24	48	60	72	96
胚胎死亡	+	+	+	+	+
孵化		+	+	+	+
心跳		+			+
體長					+
脊椎彎曲				+	+
心包膜腫大				+	+
卵黃囊腫大				+	+

3.4 數據分析

利用 SPSS 統計軟體的線性迴歸分析之 Probit model 進行斑馬魚胚胎半數致死濃度(LC₅₀)計算，由模式計算的結果取 50%斑馬魚死亡的濃度，此值即為半數致死濃度。此外胚胎觀測實驗結果如累積孵化率、心跳、體長的部分，以獨立樣本 T 檢定比較各暴露組與控制組之統計是否有顯著差異(p < 0.05 為顯著，p < 0.01 為非常顯著)。

第四章 結果與討論

4.1 斑馬魚胚胎暴露於模擬含氮廢水之毒性

為瞭解單一含氮物質對於斑馬魚胚胎的生物毒性，本研究於實驗室自行配製氨氮、硝酸鹽氮與有機氮的模擬含氮廢水，分別以氯化銨、硝酸鈉及氫氧化四甲基銨三種化合物代表，藉由觀察不同的觀測終點瞭解含氮物質對斑馬魚胚胎的影響。

4.1.1 斑馬魚胚胎之死亡率

為瞭解斑馬魚胚胎暴露於三種含氮物質，其暴露濃度與胚胎死亡的劑量效應關係，本實驗配製不同濃度的模擬含氮廢水，於暴露時間 48 與 96 小時觀察斑馬魚胚胎死亡的數量，以心跳有無停止活動作為判定的基準，且以下實驗皆有控制組作為對照，控制組的斑馬魚胚胎死亡率需小於 10% 實驗數據才可信，最後再藉由 SPSS 線性迴歸分析之 Probit 模式計算出三種含氮化合物的半數致死濃度 (LC₅₀)。

代表氨氮的化合物氯化銨在此所選擇的暴露濃度如圖 4-1(a)所示為 50~155 mg NH₃-N/L，最低濃度 80 mg NH₃-N/L 時死亡率為 28.47%，濃度 155 mg NH₃-N/L 時死亡率為 65.28%，其 48 與 96 小時的 LC₅₀ 分別為 146.5 與 111 mg NH₃-N/L。硝酸鈉為代表硝酸鹽氮的暴露化合物，此處所選擇暴露濃度範圍為 990~1650 mg NO₃⁻-N/L，如圖 4-1(b)所示，經濃度 990 mg NO₃⁻-N/L 的硝酸鈉暴露其死亡率為 29.17%，最高濃度 1650 mg NO₃⁻-N/L 的死亡率則為 70.83%，經計算可得 48 與 96 小時的 LC₅₀ 值分別為 1446.5 mg NO₃⁻-N/L 與 1347.3 mg NO₃⁻-N/L。代表有機氮的暴露化合物為氫氧化四甲基銨，暴露濃度與氯化銨同為 30~90 mg N/L，由圖 4-1(c) 可得知暴露濃度 30 mg N/L 時死亡率為 33.33%，最高濃度 90 mg N/L 則為 67.71%，Probit model 分析結果顯示其 48 與 96 小時半數致死濃度各別為 76.2 mg N/L 與

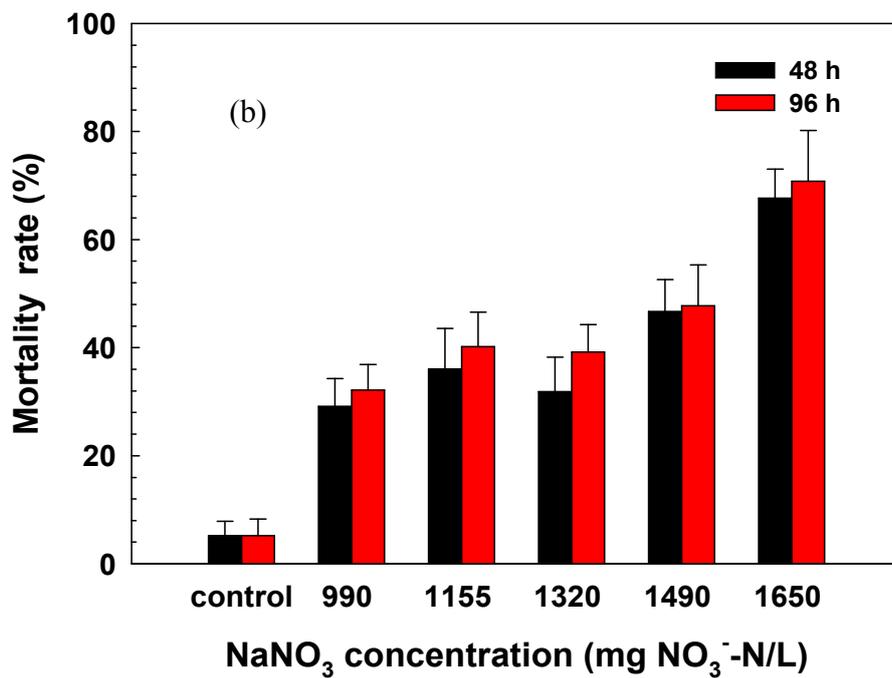
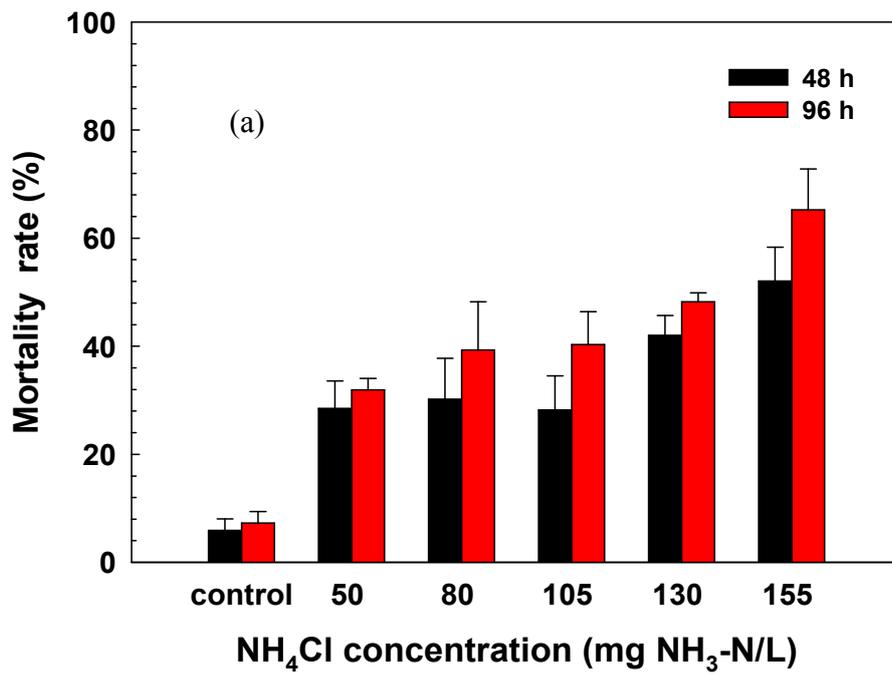


圖 4-1 模擬含氮廢水對胚胎死亡率之影響
(a)氯化銨、(b)硝酸鈉

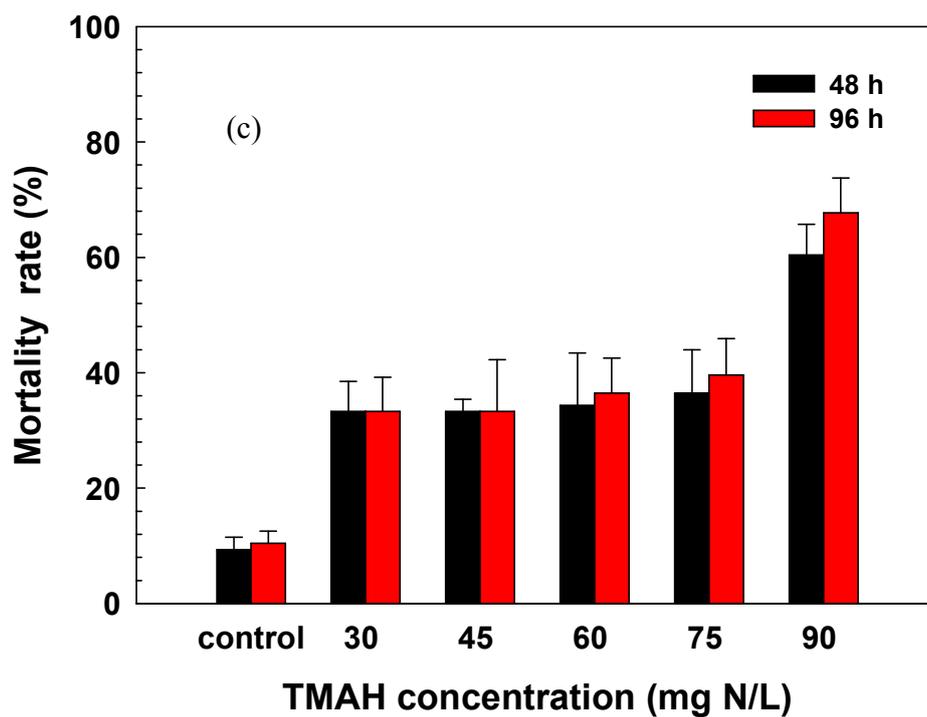


圖 4-1 模擬含氮廢水對胚胎死亡率之影響(續)
(c) 氫氧化四甲基銨

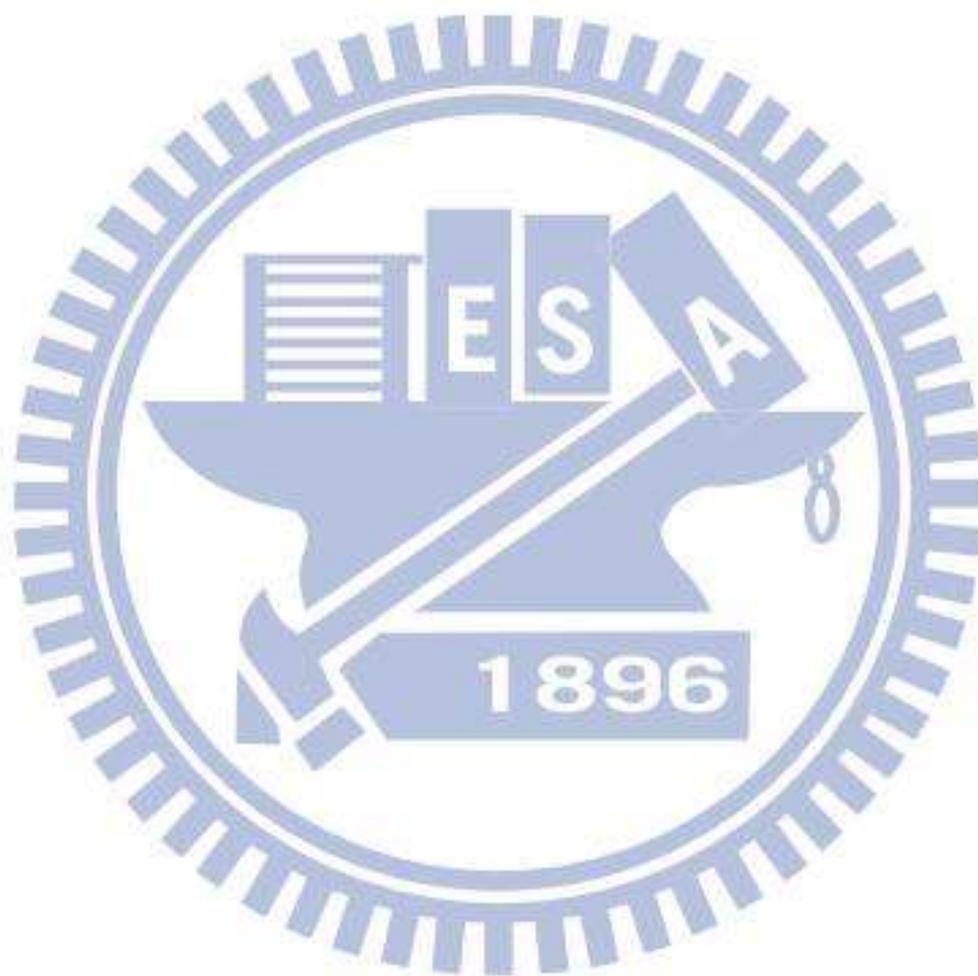
68.1 mg N/L。由以上三種含氮化合物毒性結果可得知，隨著暴露濃度與時間的增加，斑馬魚的死亡率即會跟著上升，顯示濃度與死亡率有劑量效應關係，而從半數致死濃度值(96 小時)可得知含氮物質對生物的毒性皆有所不同，其毒性由高至低依序為氯化銨(氨氮) > 氫氧化四甲基銨(有機氮) > 硝酸鈉(硝酸鹽氮)。

許多文獻皆指出上述三種含氮物質具有毒性，如 Kallqvist (2003) 將微藻 (*Nephroselmis*) 暴露於氨氮環境，在 pH 7.5 時 EC₅₀ 為 0.013 mg NH₃-N/L，而 Robert (1981) 使用兩種魚類成魚進行暴露，鱒魚(Rainbow trout)於 pH 7.3 的 96 h-LC₅₀ 為 72.7 mg NH₃-N/L，而呆頭鱗魚(Fathead minnows) 於 pH 7.01 其 96 h-LC₅₀ 則為 148 mg NH₃-N/L，對於不同階層的物種氨氮亦同樣會對生物產生毒性。Scott and Crunkilton (2000) 使用水蚤暴露於硝酸鹽氮，其 48 小時半數致死濃度為 462 NO₃⁻-N mg/L，亦有研究利用蝸牛(*Potamopyrgus antipodarum*) 進行暴露，其 96 h-LC₅₀ 則為 1042 NO₃⁻-N mg/L (Alonso and Camargo, 2003)。文獻上所使用的暴露生物雖不同，但以半數致死濃度值相比，氨氮毒性遠大於硝酸鹽氮，與本實驗有相同的趨勢。

氫氧化四甲基銨因曾發生過勞工安全意外，已證實對人體有危害，目前有研究以大鼠進行注射暴露後，發現其 4 小時半數致死劑量(LD₅₀)為 85.9 mg/L (2.38%)，且大鼠暴露後會產生呼吸頻率增加及血壓升高等現象，隨著濃度提高與拉長暴露時間會進而損害其他器官，在注射後 24 小時肝臟、腎臟與膀胱的生理機能亦會受影響(Lee *et al.*, 2011)。不過此生物毒性的暴露濃度較高，且是使用注射暴露的方式，對於流放至水體的影響尚無文獻指出。

與本毒性試驗結果相比，除了氫氧化四甲基銨則尚無水生生物暴露的研究之外，氨氮與硝酸鹽氮的半數致死濃度皆比文獻的濃度高，但這有可能因為物種不同而對毒物的耐受度有所差異。在此使用斑馬魚胚胎除了可觀察胚胎死亡的數量，亦可觀察尚未死亡的胚胎生長有無異常，如有發育異常即可證明暴露毒物會對其產生影響。為瞭解含氮物質對胚胎產生影響的最低濃度，降低三種含氮物質的暴露濃度，當致畸率達 5% 時即為此物質的最低效應濃度，最終獲得氯化銨、硝酸

鈉與氫氧化四甲基銨的 LOEC 分別為 0.41 mg NH₃-N/L、0.51 mg NO₃⁻-N/L 及 0.1 mg N/L，結果顯示含氮物質在低濃度的條件即對斑馬魚胚胎具有毒性。



4.1.2 斑馬魚胚胎之發育情形

(1) 累積孵化率

本研究觀察胚胎生長的累積孵化率，欲瞭解含氮物質對斑馬魚早期生長發育是否具有生物毒性，如圖 4-2 (a)所示，當斑馬魚胚胎暴露於氯化銨，濃度大於 80 mg NH₃-N/L 即會顯著影響胚胎的累積孵化率($p < 0.05$)，在 80~130 mg NH₃-N/L 暴露濃度的累積孵化率介於 54~67%，與控制組 91%的累積孵化率相比較低，且在 60 小時的觀察時間尚未死亡的胚胎皆已孵化。硝酸鈉暴露結果為圖 4-2(b)，自暴露濃度 990 mg NO₃⁻-N/L 開始即會顯著影響胚胎累積孵化率，累積孵化率介於 62~69%間($p < 0.01$)，相較於氯化銨，經硝酸鈉暴露的胚胎孵化時間集中在 72 小時，在高濃度 1490~1650 mg NO₃⁻-N/L 的環境下，96 小時暴露結束後仍有未孵化的胚胎，因此延長觀察時間至 120 小時，雖陸續有胚胎孵化，但依然有少許胚胎未孵化抑或直接死亡。暴露於氫氧化四甲基銨時，於圖 4-2(c)顯示除了 90 mg N/L 的累積孵化率最低為 34%，其餘範圍皆落在 60~66% ($p < 0.01$)，孵化時間主要集中在 65~72 小時間，但在 96 小時觀察時間結束後，未死亡的胚胎全部皆孵化。Kimmel (1995)指出孵化時期是胚胎分化重要的時段之一，斑馬魚胚胎正常情況在 60~72 小時為胚胎孵化最為旺盛的時間，如胚胎受精後暴露在受污染的環境或者存在外壓力的環境下生長，即會延緩胚胎孵化的時間(Hallare *et al.*, 2004; Miyachi *et al.*, 2003)，結果顯示三種含氮物質的累積孵化率皆顯著低於控制組(91%)，代表斑馬魚卵暴露於三種含氮物質皆會使胚胎的累積孵化率降低，而三者孵化的時間與控制組相比較雖較為緩慢，但大部分皆在 72 小時已全數孵化，唯獨經硝酸鈉暴露的胚胎有少數未孵化甚至直接死亡，從 4.1 節斑馬魚胚胎的死亡率結果來看，雖然硝酸鈉的半數死亡濃度值較高(96h-LC₅₀ 為 1347.3 mg NO₃⁻-N/L)，但 0.5 mg NO₃⁻-N/L 就會影響胚胎生長，此處累積孵化率的觀察亦顯示硝酸鹽氮對胚胎有可能從早期發育即有顯著的影響，如 Fraysse (2006)指出胚胎外層的絨膜為保護胚胎的一層屏障，如胚胎在發育時受到外在污染物的暴露，便以延緩孵化的方式來保護胚胎。

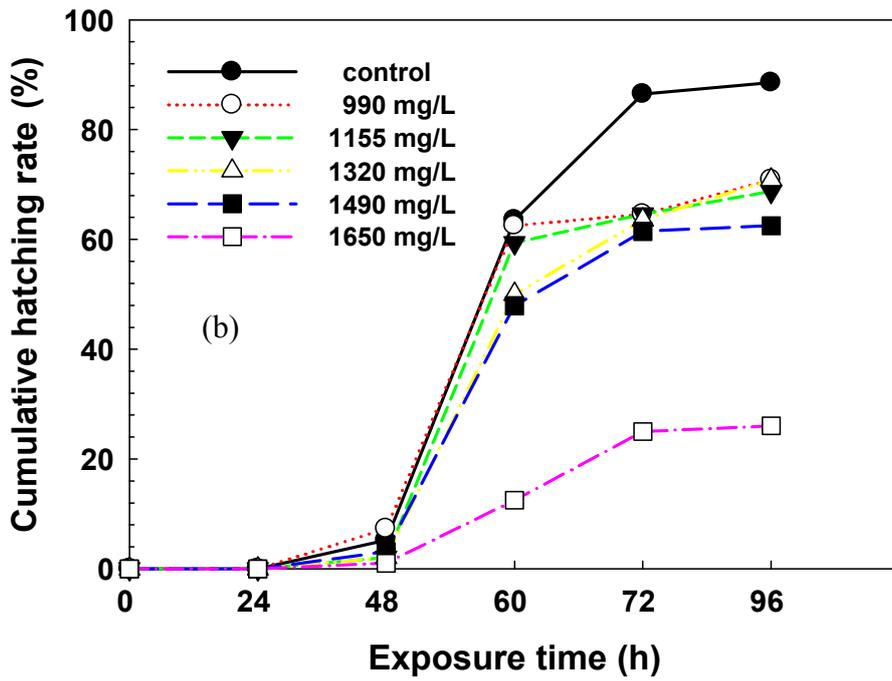
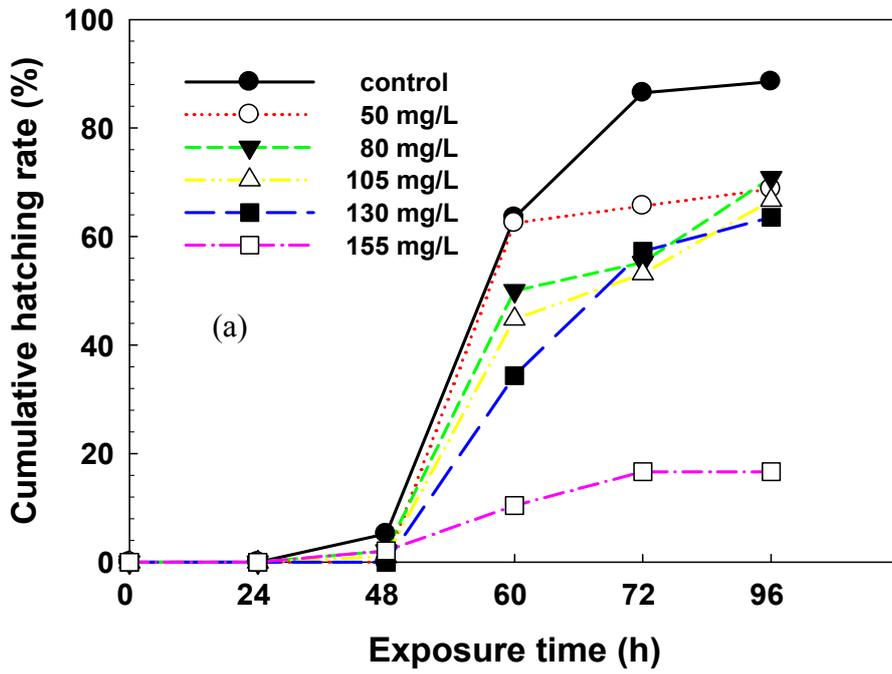


圖 4-2 模擬含氮廢水對胚胎累積孵化率之影響

(a)氯化銨、(b)硝酸鈉

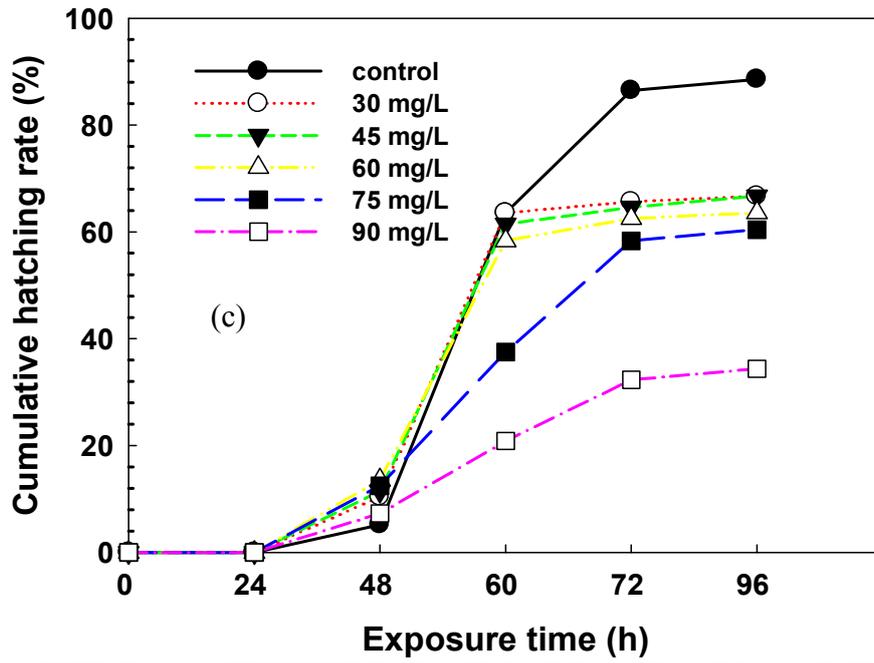


圖 4-2 模擬含氮廢水對胚胎累積孵化率之影響(續)

(c) 氫氧化四甲基銨

(2)心跳

斑馬魚胚胎自受精發育至 22 小時後才開始有心跳，亦是所有器官裡最早開始發育的器官(Kimmel *et al.*, 1995; Hill *et al.*, 2005)，由於胚胎早期的發育受環境影響很大，如果胚胎受精後即暴露於含氮物質的條件下生長，極有可能影響心臟健全的發育，因此本研究計量 48 與 96 小時斑馬魚胚胎的心跳次數，每次隨機取選取 10 隻斑馬魚胚胎，計算其 10 秒的心跳數目並與控制組比較，以瞭解含氮物質對斑馬魚胚胎心臟發育有無顯著影響。

斑馬魚胚胎暴露於氯化銨的心跳結果如圖 4-3 (a)所示，統計結果顯示不管是 48 或 96 小時，當氯化銨濃度大於 80 mg NH₃-N/L 以上就會對胚胎的心跳產生顯著影響($p < 0.01$)，控制組在 96 小時平均心跳為 32 次/10 秒，經氯化銨最高濃度 155 mg NH₃-N/L 暴露後，平均心跳只有 23.5 次/10 秒，可見氯化銨的暴露會減緩胚胎的心跳速度。而圖 4-3 (b)為胚胎暴露硝酸鈉後的心跳數，結果顯示暴露硝酸鈉濃度 990~1650 mg NO₃⁻-N/L 後，胚胎 48 及 96 小時的心跳與控制組相比皆有顯著減緩的趨勢($p < 0.05$)，由於硝酸鹽氮本身對斑馬魚胚胎的毒性較低，在此取的濃度值較高，亦有可能是此原因造成錯估的情形，為釐清硝酸鈉對胚胎心跳的影響濃度，在此將濃度值往下降低，發現 165 mg NO₃⁻-N/L 為對胚胎心跳有減緩的最低濃度。與上述兩者含氮化合物相較之下，氫氧化四甲基銨濃度大於 75 mg N/L 時(圖 4-3 (c))，胚胎的心跳才有顯著減緩的情形產生($p < 0.01$)，表示氫氧化四甲基銨對胚胎心跳產生顯著影響的濃度較高，在此推斷氫氧化四甲基銨對胚胎的毒性反應，心臟並不是最主要的影響部位。

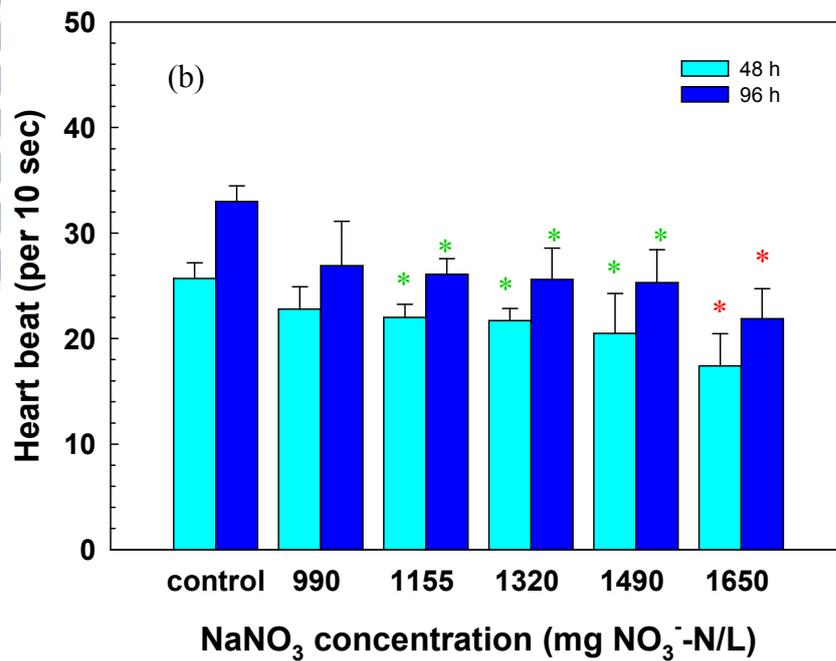
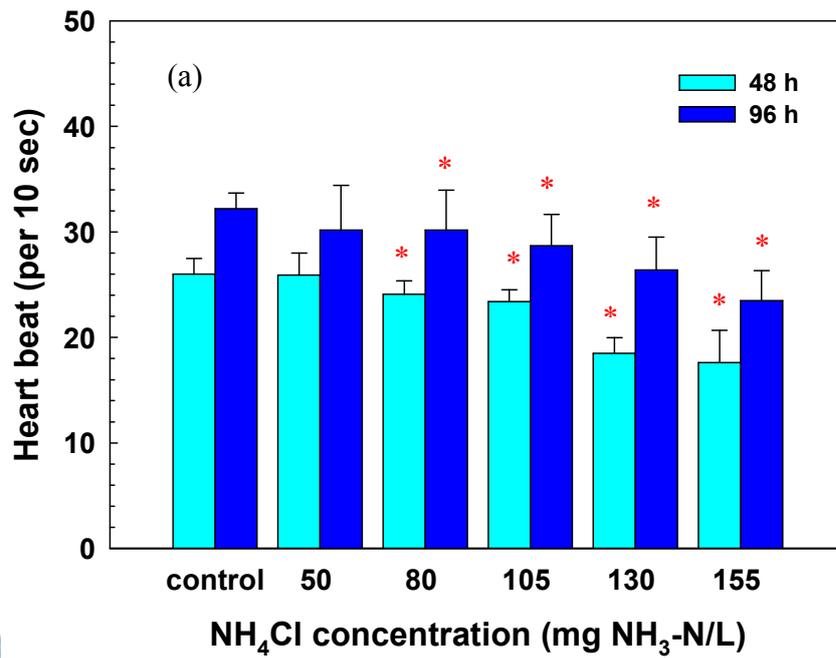


圖 4-3 模擬含氮廢水對斑馬魚心跳次數之影響
 (a)氯化銨、(b)硝酸鈉 (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$)

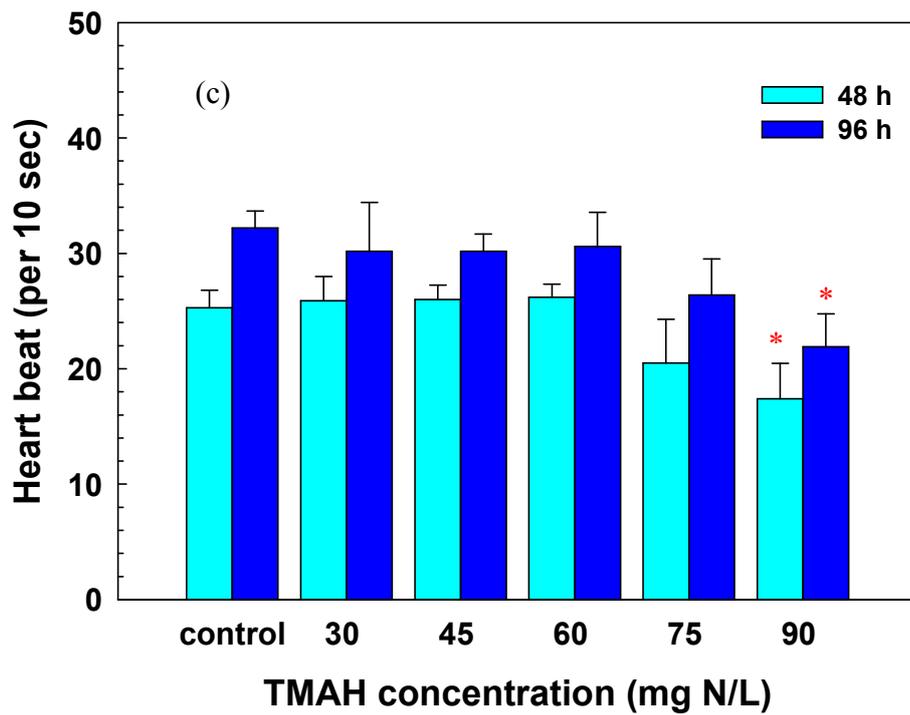


圖 4-3 模擬含氮廢水對斑馬魚心跳次數之影響(續)

(c) 氫氧化四甲基銨 (*: $p < 0.05$; *: $p < 0.01$)

(3) 幼魚致畸率與畸形表現型態

斑馬魚除了可用上述所提到的觀測終點(死亡率、累積孵化率、心跳與生長體長)瞭解毒物所產生的影響外，因暴露毒物導致斑馬魚胚胎產生發育異常的現象，胚胎與幼魚畸形發育的型態也是值得注意的觀察重點^(Braunbeck, 2005)。

圖 4-4 (a, c) 為 48 與 96 小時發育正常的胚胎與幼魚外觀型態，經過三種含氮物質的暴露後，可發現三種不同的畸形型態，圖 4-4 (d) 所示脊椎彎曲發育為第一種畸形型態，原本發育正常情況下的脊椎會如圖 4-4 (c) 的控制組呈現水平直線的線條，而隨著暴露濃度的增加其彎曲嚴重程度會加劇，有時甚至會出現圖 4-4 (e) 成 S 型彎曲的生長情形。第二及第三種畸形型態分別為心包膜腫大與卵黃囊腫大，圖 4-4 (c) 所標示心臟與卵黃囊的區域為正常生長的大小，並無腫大的現象，但在圖 4-4 (f, g) 可發現心臟區域有膨大的現象，心室與心房亦有被拉長的情形，如增加暴露濃度亦會使斑馬魚心臟區域腫大更為明顯，斑馬魚有可能如圖 4-4 (b) 尚未孵化即出現發育受阻，情況嚴重者斑馬魚會無法孵化甚至死亡，且通常在心包膜腫大更為嚴重時，同時也會有卵黃囊腫大的情形產生。

圖 4-5 為斑馬魚暴露於三種含氮物質後所產生的畸形型態數量與致畸率，暴露的劑量越高，畸形型態出現的機率越高，代表毒物濃度越高導致斑馬魚幼魚不正常發育的情況更嚴重，從圖 4-5 (a, b, c) 可看到氯化銨、硝酸鈉與氫氧化四甲基銨的致畸率分別為 60%、60% 及 90%，與氯化銨相比，雖然氫氧化四甲基銨的半數致死濃度與氯化銨相差不大卻有較高的致畸率。

觀察畸形型態出現的情形，經三種含氮物質暴露後的幼魚皆有出現脊椎彎曲與心包膜腫大的現象，只有經硝酸鈉與氫氧化四甲基銨暴露的胚胎才有出現卵黃囊腫大的畸形型態，但與脊椎彎曲和心包膜腫大出現的數量相比明顯較少。Tietge (2000) 曾指出暴露於氨氮除了會造成青蛙胚胎死亡外，還會使小青蛙有發育異常的現象，包括脊椎彎曲、顱面與腦部發育受阻以及心包膜腫大，此與本研究發現氨氮暴露的胚胎有脊椎彎曲與心包膜腫大為相同的現象。

斑馬魚胚胎經氯化銨與氫氧化四甲基銨暴露後，主要畸形發育型態為脊椎彎曲，特別是氫氧化四甲基銨在每個暴露濃度之下，脊椎彎曲的數量皆佔畸形數量的80%以上，而有別於上述兩種化合物，硝酸鈉出現心包膜腫大的畸形型態居多，比對圖 4-3 (b)硝酸鈉的心跳次數，每一個濃度皆為顯著下降，顯示兩者觀測終點有相呼應的現象。在三種含氮物質的暴露下，有可能一隻斑馬魚胚胎同時會有一種以上的畸形型態出現，經由不同暴露時間的觀察，可以發現畸形型態出現的先後順序為脊椎彎曲、心包膜腫大，最後為卵黃囊腫大。

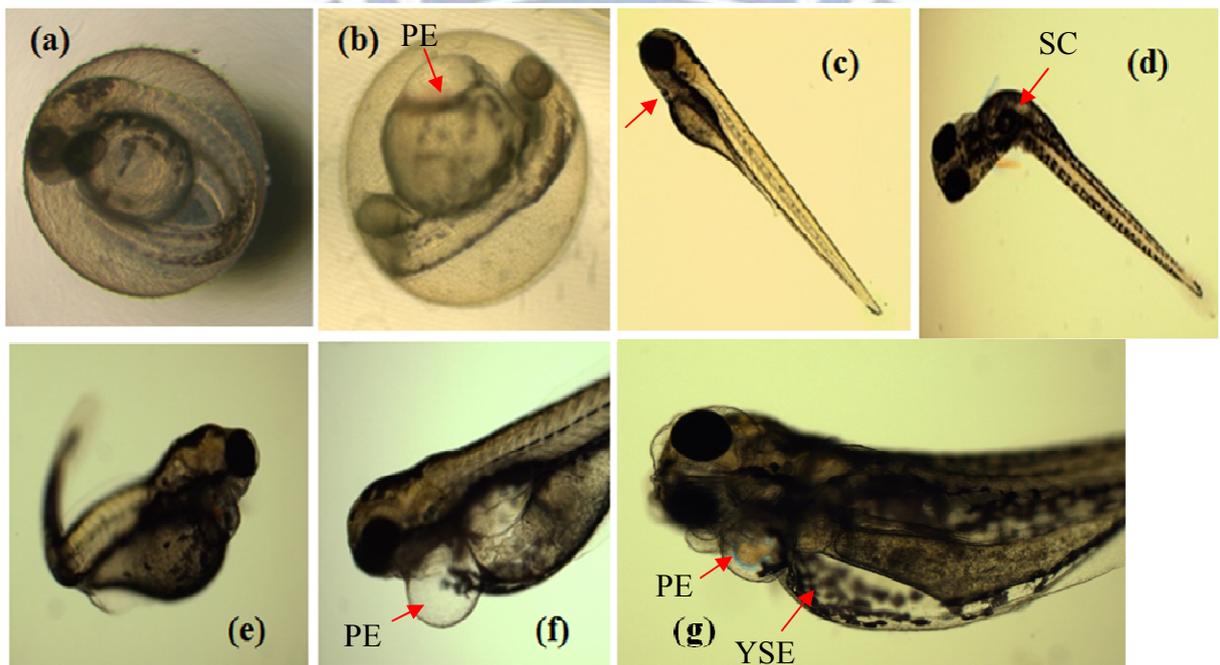


圖 4-4 模擬含氮廢水對胚胎與幼魚外觀發育之影響

(a)控制組發育 48 小時的胚胎、(b) 48 小時發育異常的胚胎、(c)控制組 96 小時正常發育狀態、(d)脊椎彎曲(SC)、(e)脊椎彎曲(SC)、(f)心包膜腫大(PE)、(g)卵黃囊腫大(YSE)

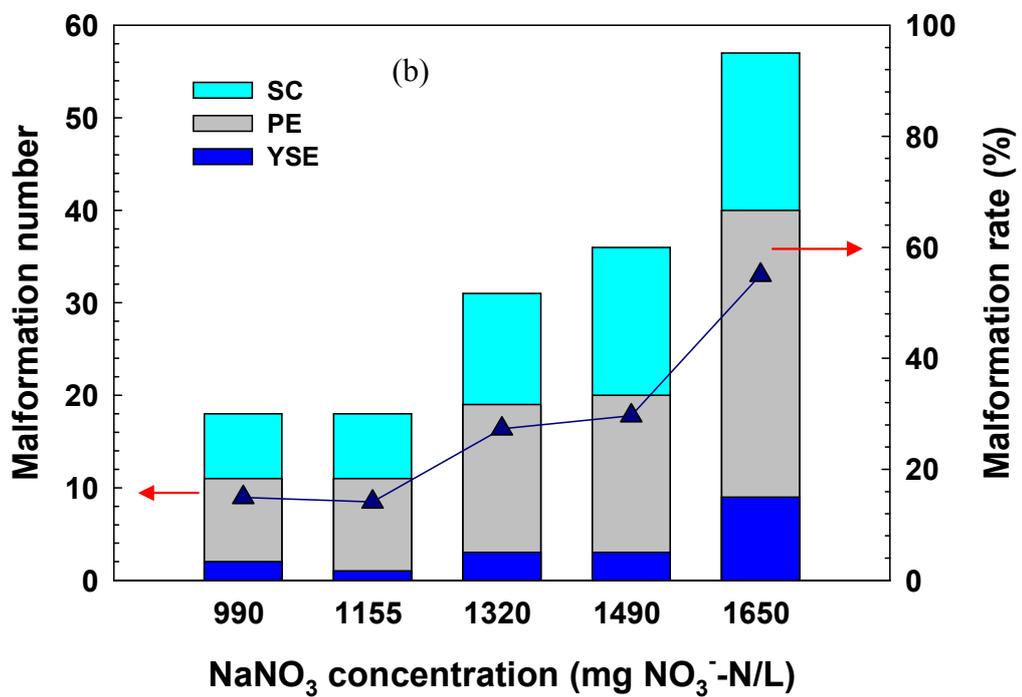
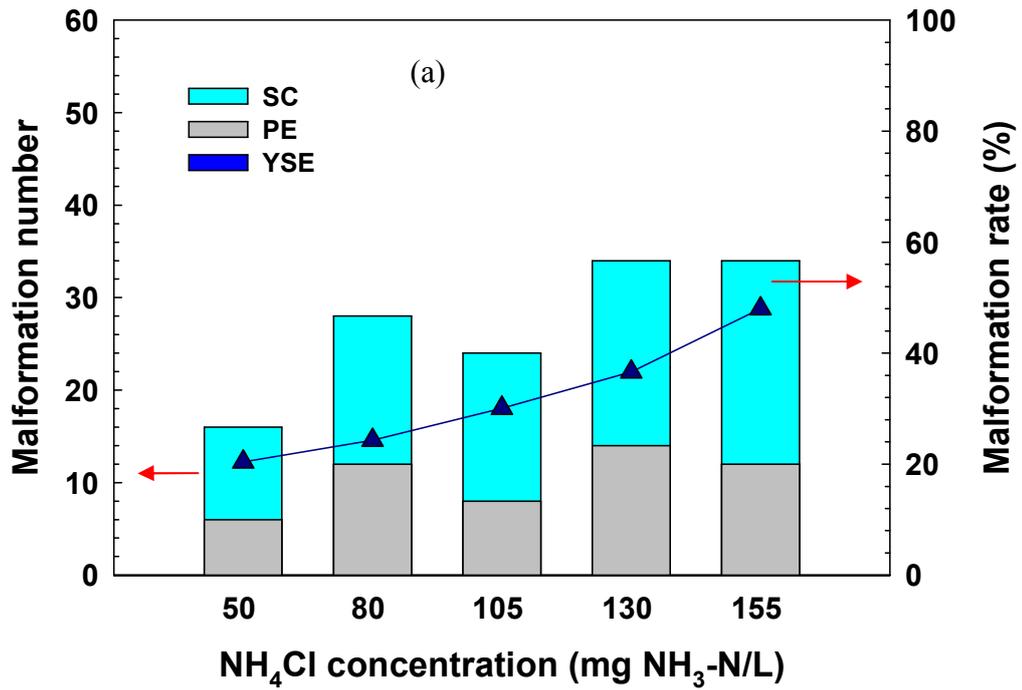


圖 4-5 模擬含氮廢水對幼魚產生之致畸率與畸形數量

(a)氯化銨、(b)硝酸鈉

(SC：脊椎彎曲；PE：心包膜腫大；YSE：卵黃囊腫大)

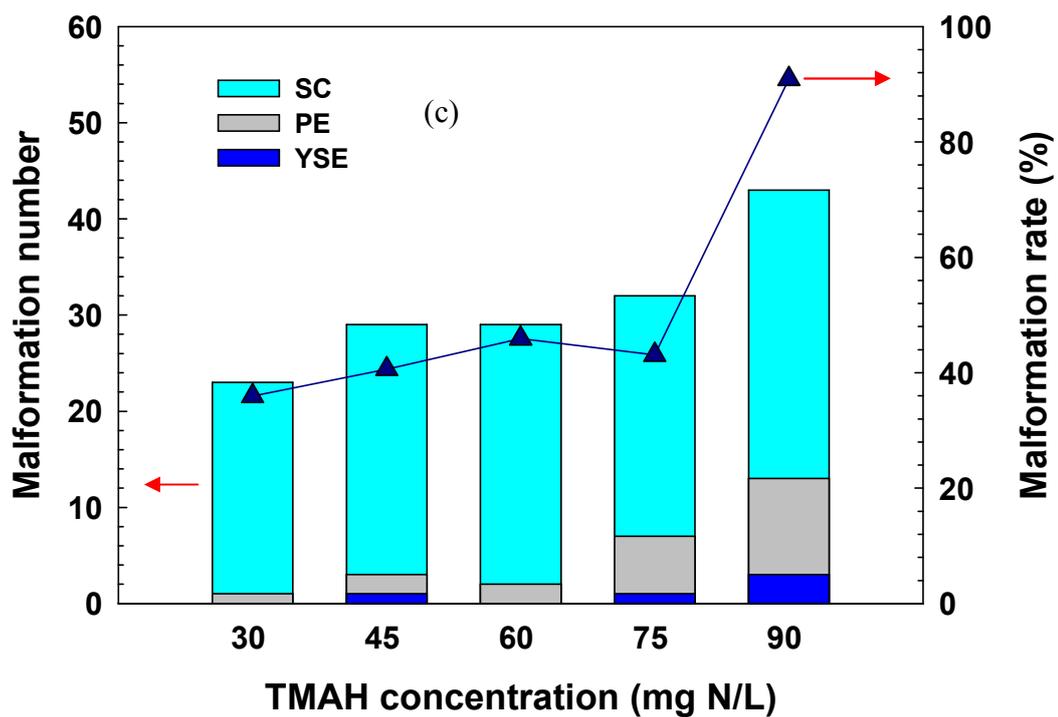


圖 4-5 模擬含氮廢水對幼魚產生之致畸率與畸形數量(續)

(c) 氮氧化四甲基銨

(SC：脊椎彎曲；PE：心包膜腫大；YSE：卵黃囊腫大)

(4)體長

綜合前述所觀察的累積孵化率、心跳與胚胎發育型態，可發現三種含氮物質在不同濃度下對胚胎皆有產生不同程度的影響，許多文獻觀察經毒物暴露的斑馬魚胚胎生長情形，發現毒性物質會推遲胚胎發育的速度，以致於影響幼魚出生後的生長體長(Hill *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2008; Carlsson *et al.*, 2013)，為探討這些因子是否會影響胚胎整體發育的情況，本研究於 96 小時量測各暴露濃度的幼魚生長體長，並以統計觀察其顯著程度(圖 4-6)。

斑馬魚胚胎暴露於所有不同濃度的含氮物質，結果顯示當胚胎暴露於氯化銨、硝酸鈉與氫氧化四甲基銨皆有生長遲緩的現象，與控制組相比皆有顯著差異($p < 0.05$)，表示經含氮物質暴露後皆會減緩斑馬魚生長的速度，當氯化銨暴露濃度為 155 mg NH₃-N/L 情況更為顯著($p < 0.01$)。而硝酸鈉濃度在 990~1650 mg NO₃⁻-N/L 生長速度同樣有趨於緩慢的情形，不過從圖 4-6 (b)可以發現硝酸鈉的最小濃度 990 mg NO₃⁻-N/L，相較於氯化銨與氫氧化四甲基銨的濃度較高，為瞭解硝酸鈉對生長體長開始有影響的濃度，此處降低濃度進行實驗，因此發現於濃度 82.35 mg NO₃⁻-N/L 時生長的速度無顯著差異，即表示硝酸鈉需濃度大於 90 mg NO₃⁻-N/L 對胚胎體長的減緩才有顯著差異。氫氧化四甲基銨在濃度 60 mg N/L 以上才有生長速度減緩的現象(圖 4-6 (c))，與控制組相比才有顯著差異($p < 0.05$)，暴露濃度為 90 mg N/L 時差異更為顯著($p < 0.01$)。從氯化銨、硝酸鈉與氫氧化四甲基銨體長量測與統計的結果顯示，氯化銨在較低的濃度即對胚胎生長體長有顯著影響。

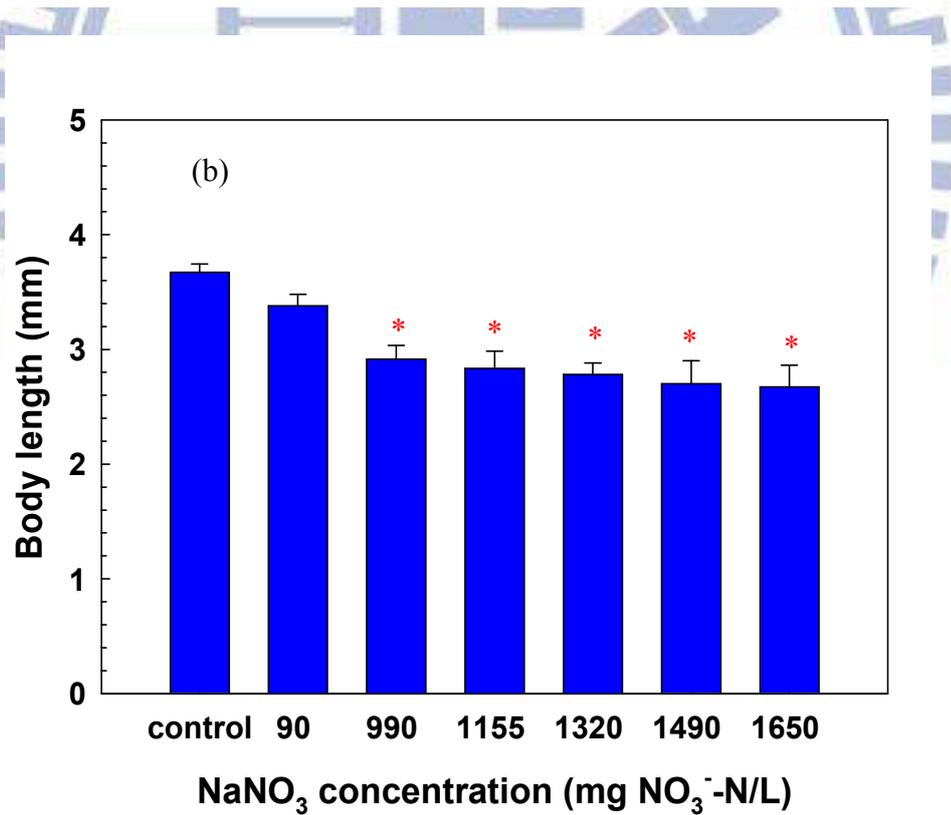
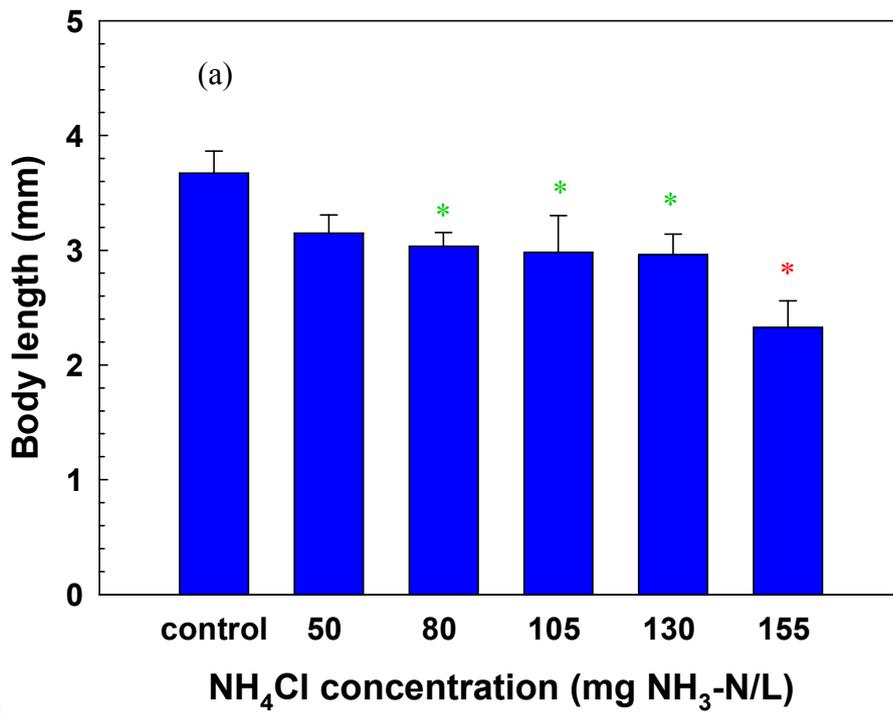


圖 4- 6 模擬含氮廢水對幼魚生長體長之影響
 (a)氯化銨、(b)硝酸鈉 (*: p < 0.05; *: p < 0.01)

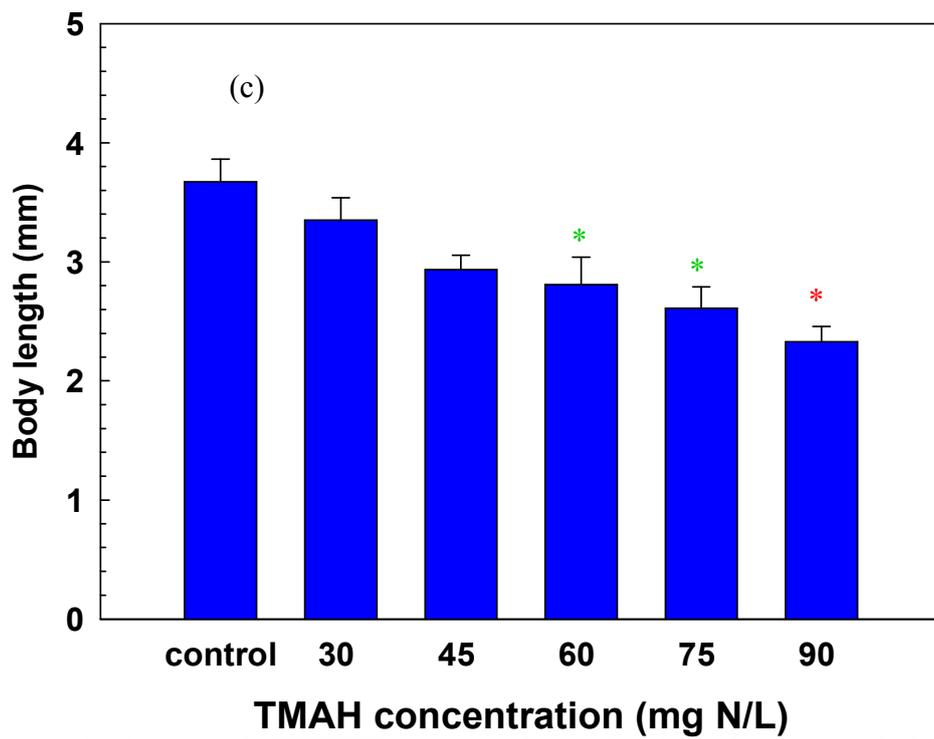


圖 4-6 模擬含氮廢水對幼魚生長體長之影響
(c) 氫氧化四甲基銨 (*: $p < 0.05$; *: $p < 0.01$)

4.2 斑馬魚胚胎暴露於半導體廢水之毒性

在針對斑馬魚胚胎暴露於單一含氮物質的毒性結果進行分析後，發現暴露於低濃度單一含氮物質即會對斑馬魚胚胎生長產生不同的影響，為瞭解斑馬魚胚胎毒性試驗用於評估半導體廢水的可行性，以及觀測暴露後幼魚生長的變化，我們取某半導體廠的廢水進行毒性試驗，進而找出與實驗室配置溶液其相似或差異處。

4.2.1 水質特性分析

本實驗使用取自某半導體廠的三股廢水，分別為氟系廢水與化學研磨(HF/CMP)製程混合廢水、製程酸鹼廢水與出流水，取回後對它們的水質成份進行分析，此處所分析的項目如表 4-1 所示共有八個項目，除了偵測基本的水質參數，亦分析廢水中可能對胚胎產生毒性的離子種類，如氟、氯、硝酸鹽與銨離子。

第一股廢水為 HF/CMP 製程混合廢水，氟系廢水主要使用的化學物質為高濃度氫氟酸，不僅 pH 值較低亦含有大量的氟離子，此處分析氟離子的濃度為 66.09 mg/L，為三股廢水中氟離子濃度最高的廢水，而化學研磨廢水製作過程所使用的 pH 緩衝劑與氧化劑，如硝酸、氯氣與氫氧化四甲基銨也在廢水中貢獻硝酸鹽與銨離子，此股廢水的硝酸鹽離子濃度為 3.23 mg NO₃⁻-N/L，銨離子則是 22.60 mg NH₃-N/L，由於這兩股廢水的成分一股偏酸性，另一股偏鹼性，此公司為方便後端廢水處理將其混合，混合後之 pH 值為 9.11，導電度 883 μS/cm。

第二股為酸鹼廢水，半導體製程常會使用強酸、鹼的化學物質，有氧化劑、清氧化氨、氟化氨以及許多雜酸，使用後會排放到酸鹼中和槽以便處理，酸鹼廢水中除了含有有機質還有大量的離子，從 COD 濃度 210 mg/L 來看為三股廢水中最高的，銨離子的濃度與 HF/CMP 混合廢水為 22.80 mg NH₃-N/L，而因使用的藥劑與 HF/CMP 不同，硝酸鹽的濃度只有 0.52 mg NO₃⁻-N/L。

上述兩股廢水皆為半導體的代表性廢水，適合用來評估半導體廢水對斑馬魚胚胎的生物毒性，並探討主要影響毒性的物質，而第三股所取的為經處理過之出

流水，由於近年半導體製程的出流水含有高濃度氮氮的問題備受關注，也於 100 年開始對氮氮濃度進行管制，可看到表 4-1 出流水的銨離子濃度為三股廢水中最高的，而因出流水為氟系、化學研磨與酸鹼廢水綜合而成，含有較多離子所以導電度也較高為 3339 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 。經處理過的出流水因最後會排放至水體，代表其生物毒性評估的結果亦可反應至水體環境的生物，如果出流水對斑馬魚胚胎的生長與存活有影響，則有可能對水體的生物產生危害。

表 4-1 實廠廢水水質特性分析

水樣/項目	pH	導電度 ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Cl^- (mg/L)	F^- (mg/L)	NO_3^--N (mg/L)	NH_3-N (mg/L)	COD (mg/L)	TOC (mg/L)
HF/CMP	9.11	883	5.47	66.09	3.23	22.60	120	43.54
酸鹼廢水	7.83	1260	106.79	0.13	0.52	22.80	210	44.94
出流水	8.37	3339	864.68	5.47	3.50	53.11	80	19.89

4.2.2 斑馬魚胚胎之死亡率與發育情形

(1) 氟系與化學研磨製程混合廢水

氟系與化學研磨混合廢水對斑馬魚胚胎死亡率的結果如圖 4-7 所示，胚胎暴露水樣 48 小時後，死亡率皆低於 20%，且對於累積孵化率的影響僅 100% 的水樣有顯著的影響外，其餘的濃度和控制組相較皆無顯著差異，結果如圖 4-8 (a) 所示。當此股混合廢水稀釋濃度在 40% 以上，心跳有顯著趨緩的現象(圖 4-8 (b))；在暴露 96 小時後，發現斑馬魚的死亡率驟增，推測在胚胎發育時期，心臟即有發育異常的現象產生，實驗結果和畸形發育的型態相符，如圖 4-8 (d) 所示。水樣稀釋濃度為 100% 時，致畸率為 60%，以心包膜腫大為主要的畸形型態。Lin (2012) 指出若斑馬魚胚胎心臟發育異常，如心肌肥大或腔室腫大等，易導致全身血流運輸不良，致使後期心臟無法正常供血影響胚胎養分的運送，各部位的器官亦在暴露時間拉長後亦喪失功能而使胚胎死亡。此外，在胚胎暴露 72 小時亦可發現心跳趨緩的情形漸增(圖 4-8 (b))，且腦部血液循環變慢，甚至出現腦部組織壞死，而存活的胚胎則有生長速率減緩的現象(圖 4-8 (c))，暴露濃度在 40% 以上可發現斑馬魚幼魚體長有顯著減少的情形發生($p < 0.01$)。表示雖然此股混合廢水不會直接造成斑馬魚胚胎的死亡，但是卻對其心臟的發展產生抑制，進而降低其心跳速率，且造成心包膜腫大的畸形現象發生。

由於此股廢水為氟系與化學研磨混合廢水，如表 4-1 所示廢水中氟離子與氟離子的濃度較高，因此不可排除氟離子對胚胎亦有可能產生生長影響，不過在文獻中氟離子對水體生物雖然有生物毒性，可是文中提到使用小於 3 克的虹鱒 (*Oncorhynchus mykiss*) 暴露於氟離子其 96 h-LC₅₀ 值為 200 mg F⁻/L，而小於 1 克的三刺魚 (*Gasterosteus aculeatus*) 暴露後其 96 h-LC₅₀ 值則更高為 340 mg F⁻/L (Camargo *et al.*, 2003)，與此股廢水的 66.09 mg/L 氟離子相比濃度更高，因此推測本實驗中氟離子所產生的毒性影響較低。

如果以廢水水質分析成份來推斷，此股廢水主要毒性來源有可能是銨離子，

不過胚胎在暴露實驗室配製的氯化銨溶液並沒有出現 96 小時才突然死亡的情形，從表 4-1 可以發現此股廢水還含有 3.23 mg NO₃⁻-N/L 的硝酸鹽離子，此處胚胎發育畸形型態以心包膜腫大為主，與實驗室配製的硝酸鈉溶液有相同的結果，推測有可能是銨離子與硝酸鹽離子同時存在，而對胚胎產生加成的毒性效應。

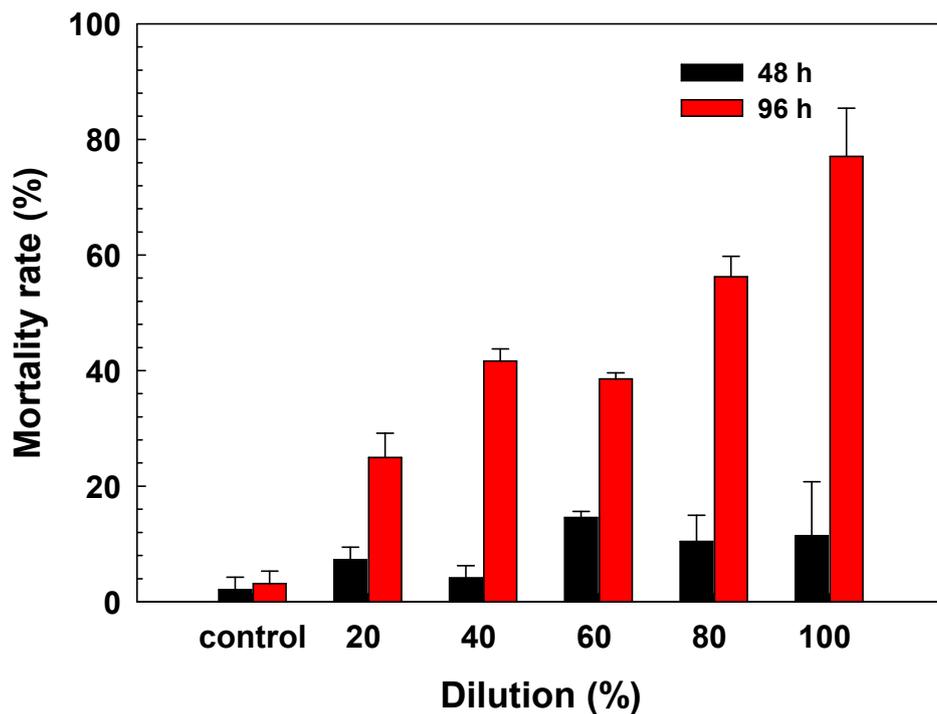


圖 4-7 不同稀釋倍數之 HF/CMP 製程混合廢水對斑馬魚胚胎死亡率之影響

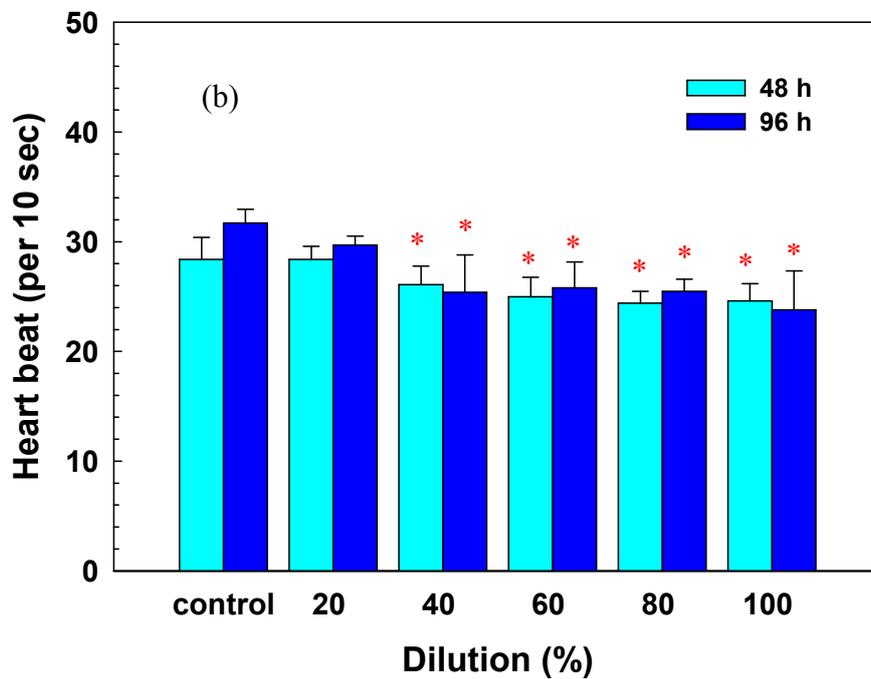
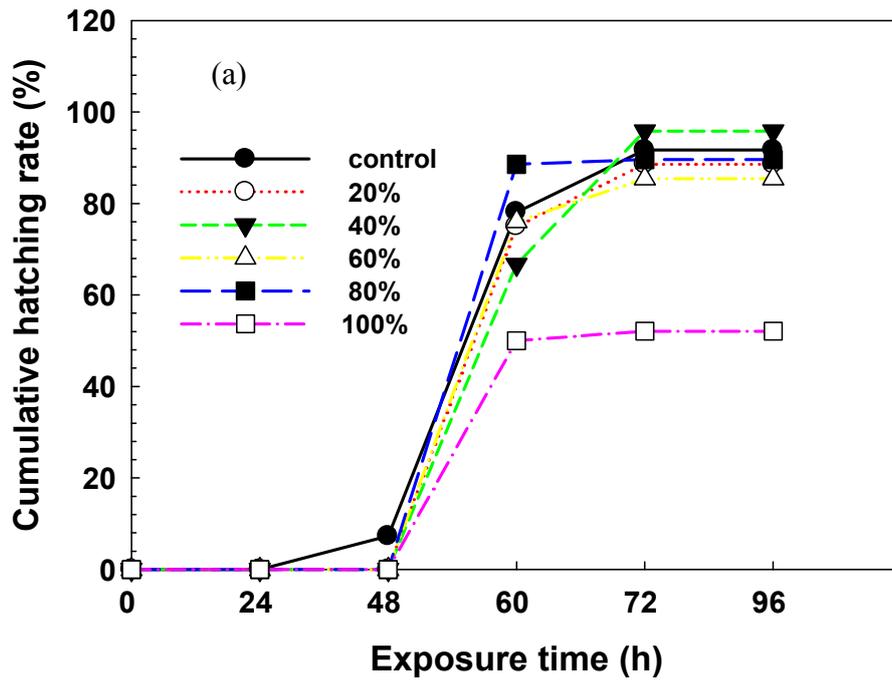


圖 4-8 不同稀釋倍數之 HF/CMP 製程混合廢水對斑馬魚胚胎發育之影響
 (a)累積孵化率、(b)心跳 (*: $p < 0.05$; *: $p < 0.01$)

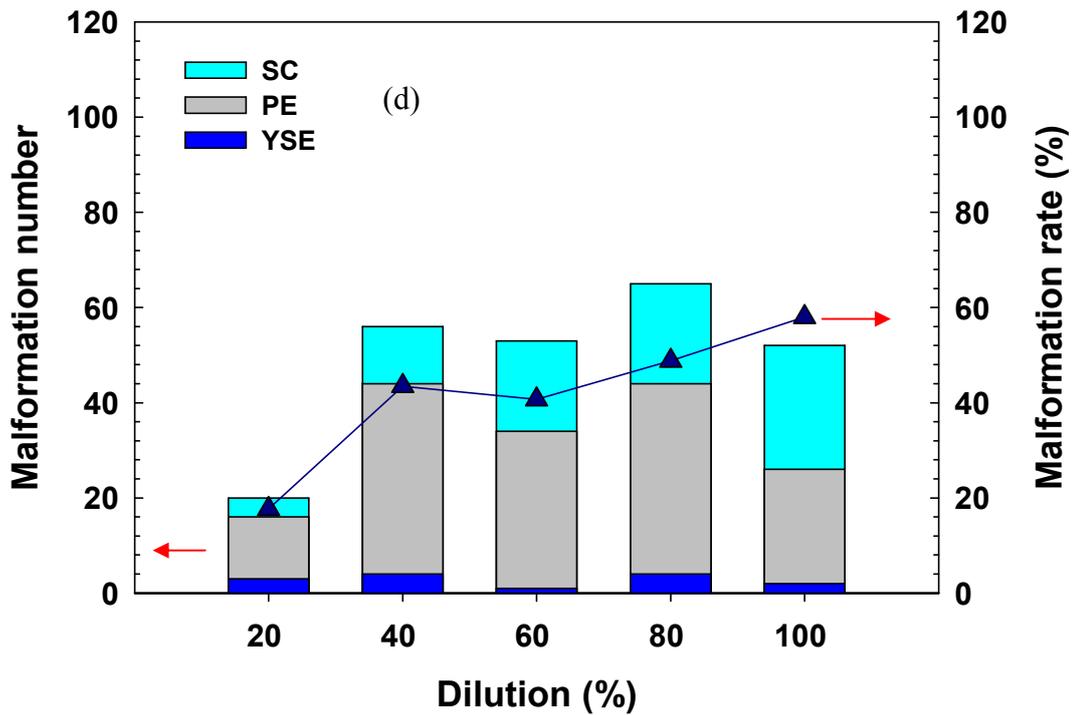
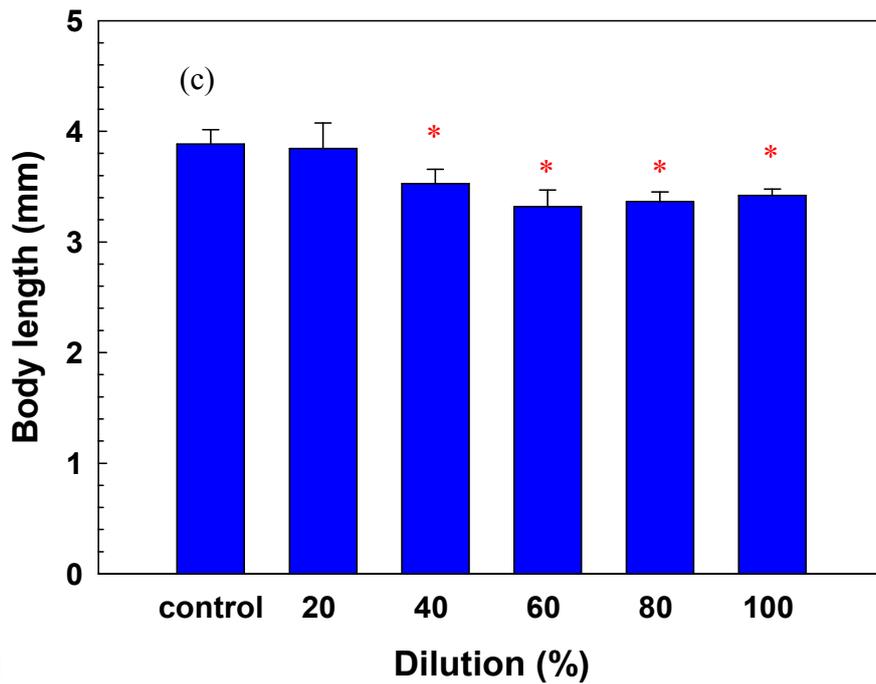


圖 4-8 不同稀釋倍數之 HF/CMP 製程混合廢水對斑馬魚胚胎發育之影響(續)

(c)體長、(d)致畸率與畸形型態數量

(SC：脊椎彎曲；PE：心包膜腫大；YSE：卵黃囊腫大；*：p < 0.05；*：p < 0.01)

(2)酸鹼廢水

半導體製程常會使用強酸、強鹼化學物質作為氧化劑或清洗劑，因此以斑馬魚胚胎評估此代表性廢水可瞭解其對生物的毒性危害程度，對胚胎早期發育有影響的部位。從圖 4-9 可看到經酸鹼廢水暴露的胚胎，在所有暴露濃度其 48 與 96 小時的死亡率雖皆小於 20%，但圖 4-10 (a)的累積孵化率卻發現有延遲孵化的現象，以控制組為標準，孵化時間大多發生在 60~72 小時之間，但在這段時間各個暴露濃度大部分的胚胎皆尚未孵化，且有些濃度的胚胎一直到 96 小時依然未孵化，當暴露濃度更高的時候未孵化的胚胎數量更多，為觀察這些胚胎後續的生長情形，此處延長觀察胚胎孵化的時間至 120 小時，結果在 120 小時進行胚胎觀察時，發現濃度較高的暴露組期胚胎雖然有孵化成功，但卻在孵化後死亡，可由圖 4-9 得知濃度 80%與 100%的死亡率在 120 小時明顯上升。

從圖 4-10 (b)可看到對於心跳次數的觀察，不管在 48 或 96 小時，任何濃度的心跳次數與控制組相比皆有顯著的下降($p < 0.01$)，代表此股廢水的毒性物質在胚胎的發育早期即對心臟發育有明顯的影響，在圖 4-10 (d)也可以發現在濃度 100%時，胚胎的致畸率高達 95%，即表示只要有孵化的胚胎即有發育異常的情形，而且可發現在所有暴露濃度主要的畸形發育型態為心包膜腫大，與圖 4-10 (b)的心跳量測結果有相同的趨勢。此情形同樣也發生在圖 4-10 (c)的生長體長，在所有的暴露濃度下，皆有生長受到抑制的現象，統計結果非常顯著($p < 0.001$)。

因暴露濃度 80%與 100%的胚胎在 120 小時有大量死亡的情形，但從表 4-1 的分析物質濃度來看，當濃度為 80%時，氟離子與硝酸鹽離子的濃度並不會使胚胎死亡(Scott and Crunkilton, 2000; Camargo *et al.*, 2003)，而此時的銨離子濃度約 18.5 mg NH₃-N/L，依照實驗室配製的濃度來判斷，並不會造成胚胎大量死亡，因此酸鹼廢水中主要產生毒性的物質可能是未偵測出物質所產生的影響，抑或是物質間毒性加成作用所致。

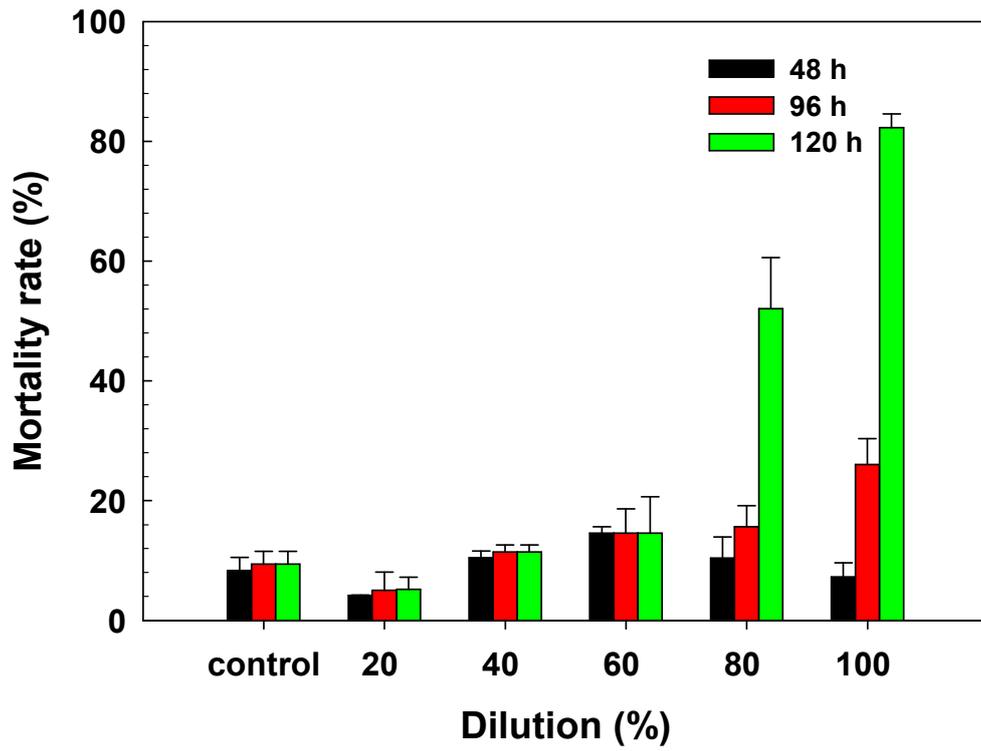


圖 4-9 不同稀釋倍數之製程酸鹼廢水對斑馬魚胚胎死亡率之影響



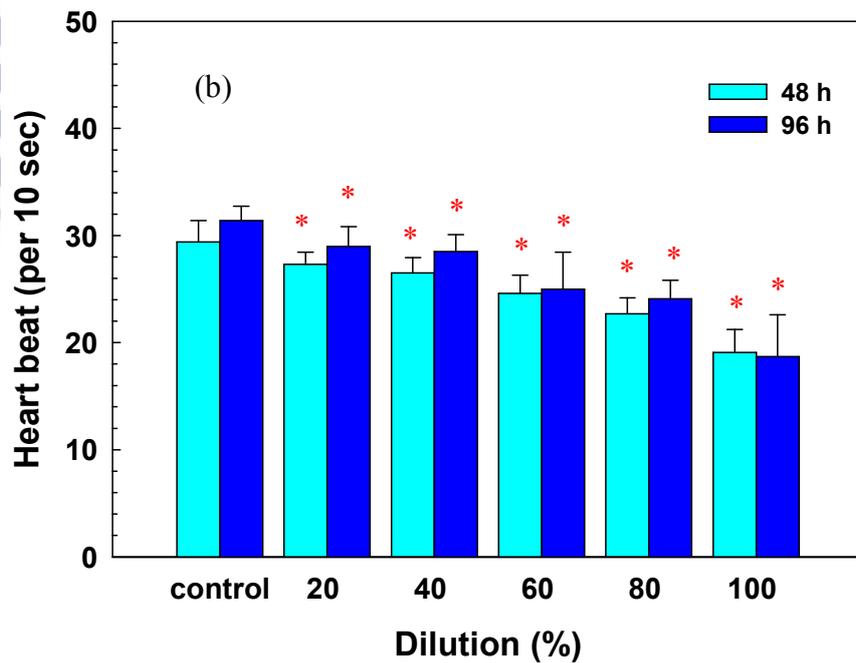
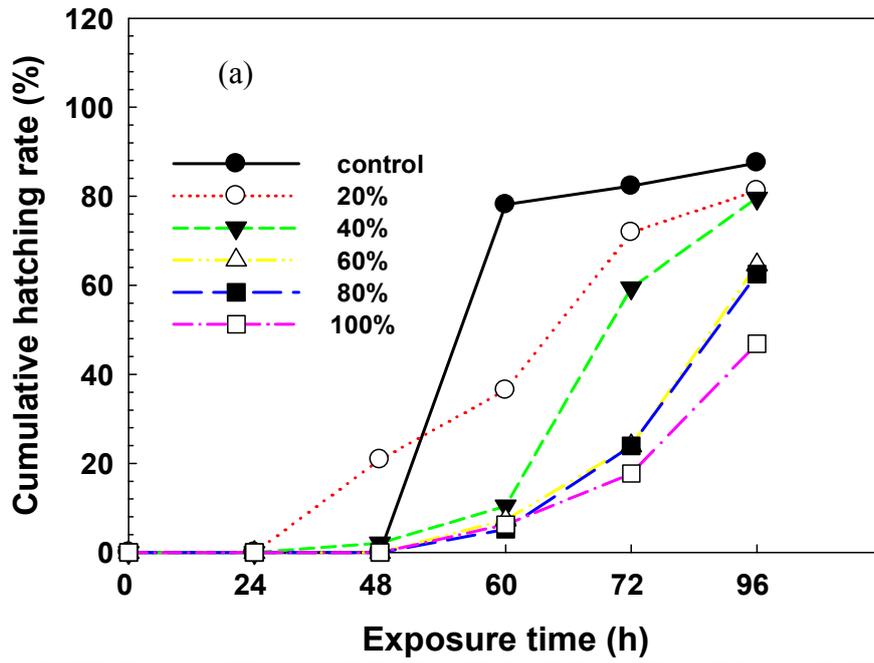


圖 4-10 不同稀釋倍數之製程酸鹼廢水對斑馬魚胚胎發育之影響
 (a)累積孵化率、(b)心跳 (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$)

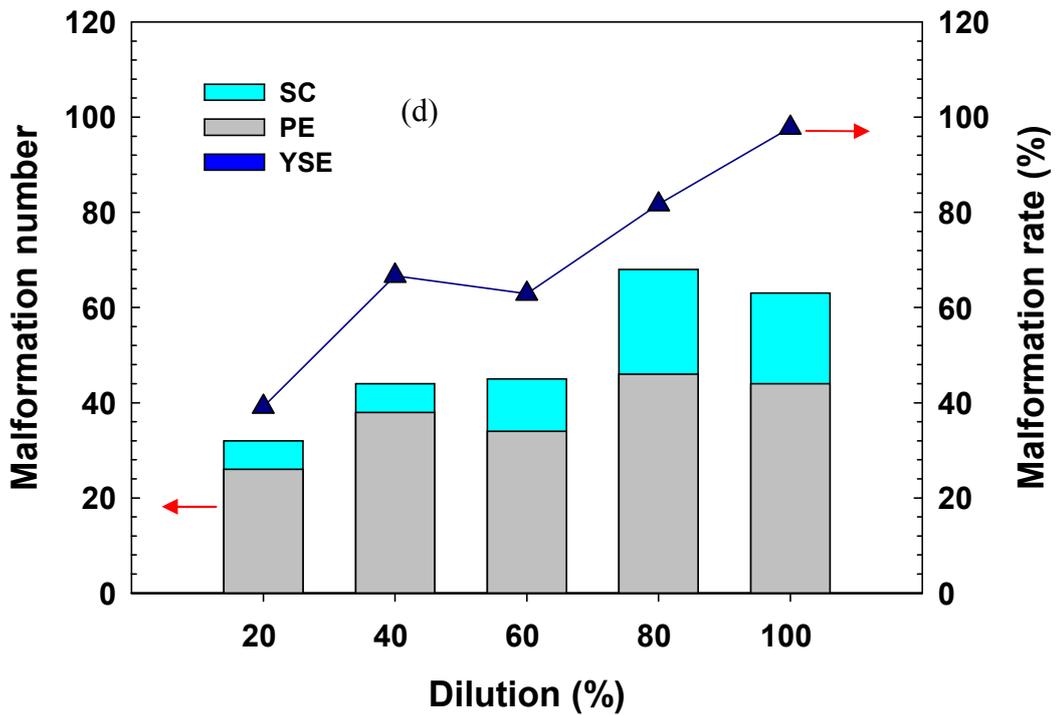
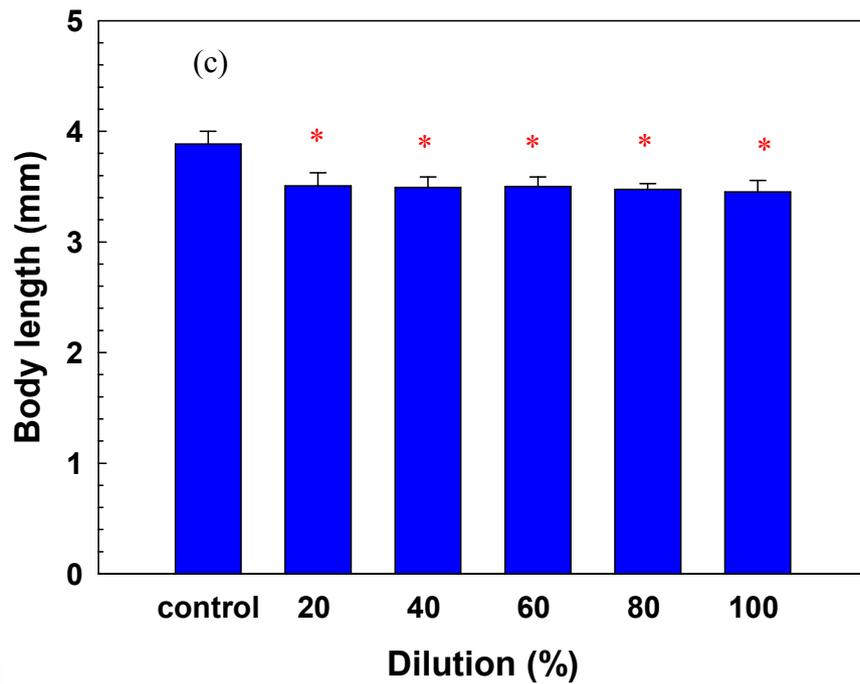


圖 4-10 不同稀釋倍數之製程酸鹼廢水對斑馬魚胚胎發育之影響(續)

(c)體長、(d)致畸率與畸形型態數量

(SC：脊椎彎曲；PE：心包膜腫大；YSE：卵黃囊腫大；*：p < 0.05；*：p < 0.01)

(3) 出流水

出流水排放雖然有法規管制其排放濃度，但卻無法確保流放至水體後對水生生物的安全性，因此本實驗使用斑馬魚胚胎評估其生物毒性，除了評估此股廢水對斑馬魚胚胎存活率的影響，亦將出流水稀釋為不同倍數，降低廢水中各污染物的濃度，以分析各污染質可能對胚胎產生的影響。

斑馬魚胚胎暴露於各不同稀釋倍數的出流水，從圖 4-11 可以看到經出流水暴露後，不管是 48 或 96 小時，各個稀釋倍數的死亡率皆不超過 20%，如單以死亡率來評估此股廢水對胚胎的生物毒性，跟上述 HF/CMP 與酸鹼兩股廢水相比毒性是較低的。從累積孵化率來看(圖 4-12 (a))，胚胎在暴露 20% 的出流水即會抑制其孵化的速度與成功率，當濃度提高抑制的程度更加嚴重，暴露於濃度 40% 以上的出流水時僅只有低於 60% 的胚胎孵化成功，可是這些未孵化的胚胎依然有心跳尚未死亡，為瞭解其後續孵化或存活的狀況，此處將觀測時間延長至 120 小時，發現這些尚未孵化的胚胎在延長觀察時間後約 15% 孵化成功，但大多數依然以胚胎形式存活甚至已有部分胚胎死亡，可能是胚胎生存的環境存在著毒性物質，雖然不至於導致胚胎直接死亡，但外在的毒物使胚胎產生壓力反應，而減緩絨毛膜敷化酵素的產生，導致胚胎無法孵化成幼魚(Hallare *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2007)。

心跳量測結果為圖 4-12 (b)，經統計計算 48 小時的心跳與控制組相比皆有顯著降低($p < 0.05$)，尤其暴露 40% 以上的出流水其統計結果更為顯著($p < 0.01$)，與累積孵化率互相對照，同樣在稀釋倍數 40% 的時候對孵化的抑制情形便明顯，心臟為供給全身血液運送及養分供給的重要器官(Incardona *et al.*, 2004)，假如早期發育時心跳變緩慢，對於全身養分的供給效率亦會降低，同樣的結果亦反應在胚胎孵化後幼魚的發育體長(圖 4-12 (c))，當暴露濃度 80% 的時候，與控制組相比有生長速度趨緩的現象($p < 0.01$)，不過將 96 小時的胚胎心跳次數與控制組進行統計比較時，發現原本 48 小時有統計顯著的濃度反而不顯著，僅剩暴露濃度 100% 的胚胎有顯

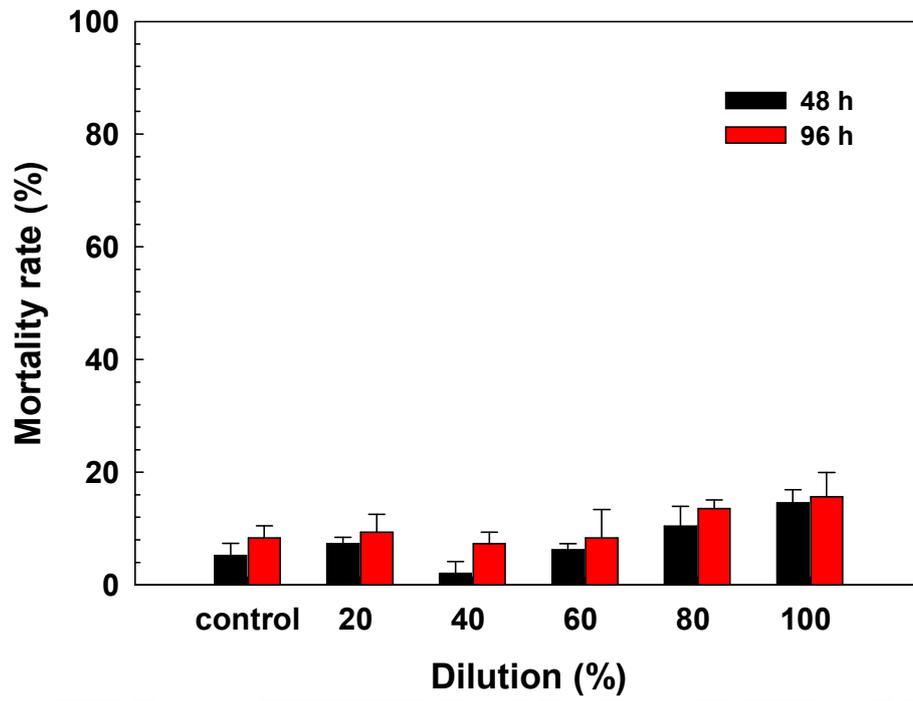


圖 4-11 不同稀釋倍數之出流水對斑馬魚胚胎死亡率之影響



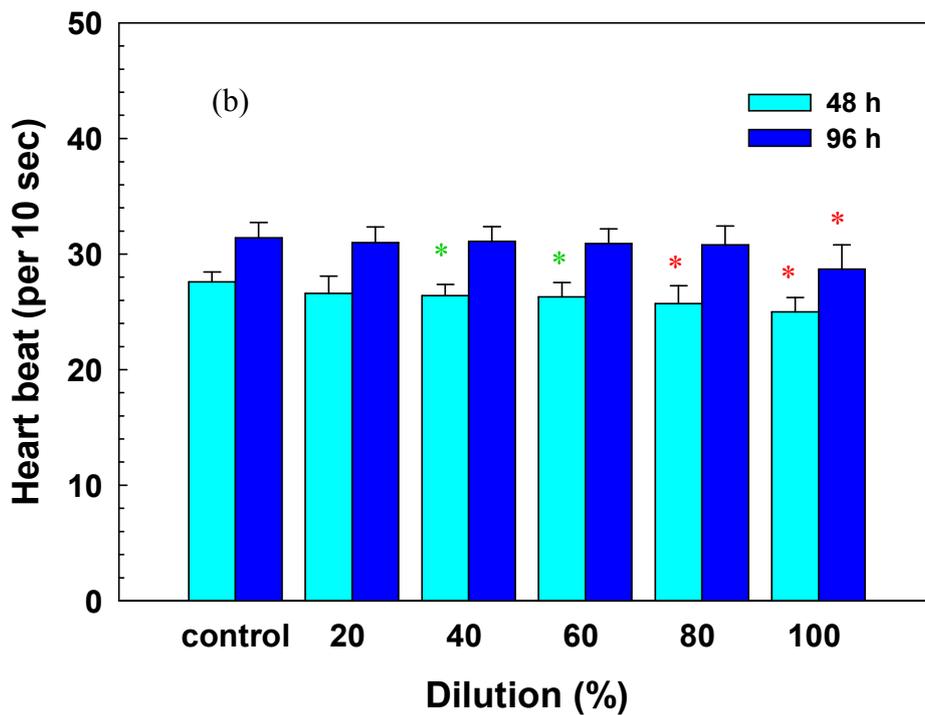
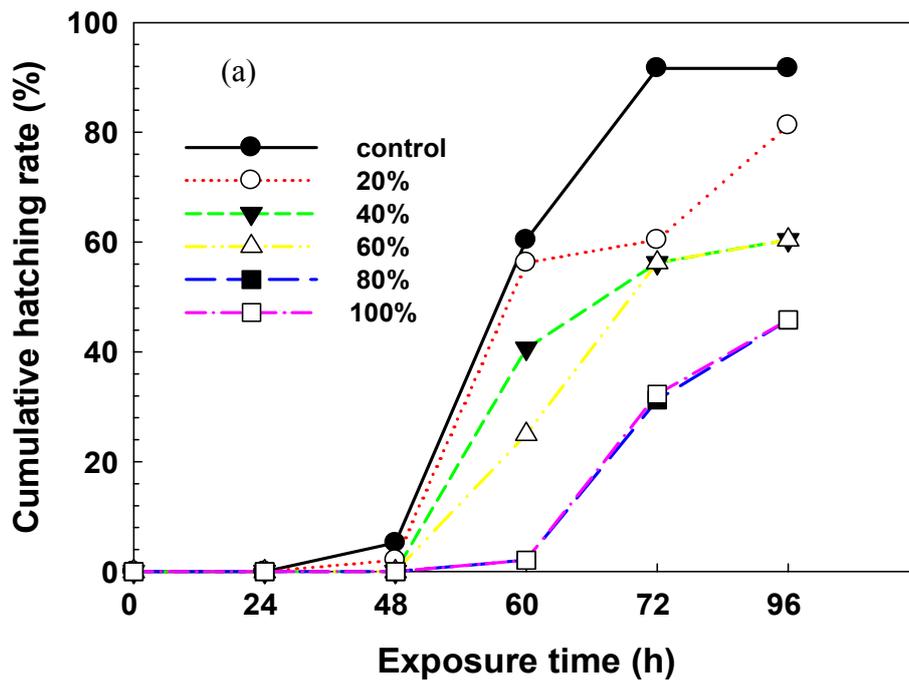


圖 4- 12 不同稀釋倍數之出流水對斑馬魚胚胎發育之影響
 (a)累積孵化率、(b)心跳 (*: $p < 0.05$; *: $p < 0.01$)

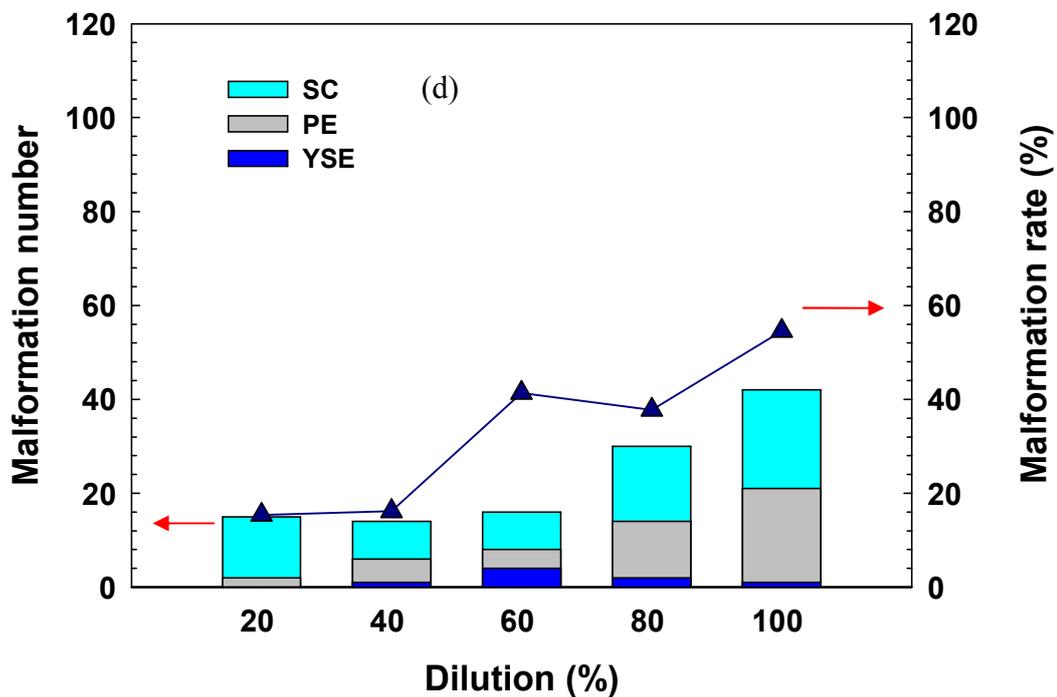
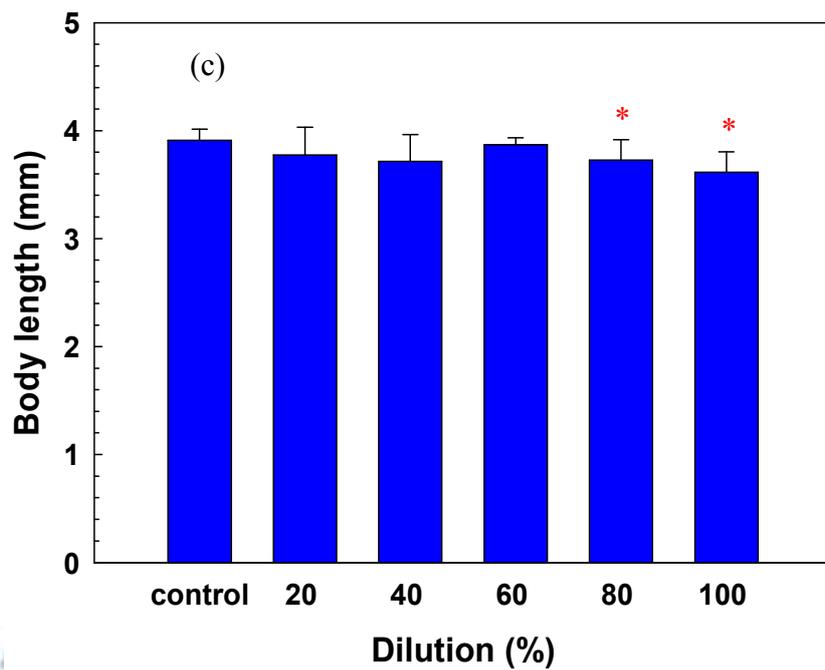


圖 4-12 不同稀釋倍數之出流水對斑馬魚胚胎發育之影響(續)

(c)體長、(d)致畸率與畸形型態數量

(SC：脊椎彎曲; PE：心包膜腫大; YSE：卵黃囊腫大；*：p < 0.05; *：p < 0.01)

著差異($p < 0.01$)。可能是因暴露 48 小時心臟發育尚未完全，對於環境的影響比較敏感，不過 Hill (2005)曾指出斑馬魚胚胎相較於嚙齒類動物，如在發育時心臟受損程度不嚴重，亦有可能在發育完全後恢復其生理機能。雖某些濃度的出流水不致於影響心跳功能，但從發育型態來分析，這些低濃度的毒性物質依然對胚胎生長產生畸形發育的現象，圖 4-12 (d)即為暴露於不同濃度的出流水產生畸形發育的機率，以及各個畸形型態出現的數量，當暴露濃度為 100%時，銨離子的濃度為 53.11 mg NH₃-N/L，與圖 4-5 (a)氯化銨濃度 50 mg NH₃-N/L 的畸形率相比，畸形率雖比實驗室配製溶液高，但因這裡還存在 3.50 mg NO₃⁻-N/L 的硝酸鹽離子，亦有可能對胚胎發育畸形率產生加成的作用，以發育型態來看，這裡脊椎彎曲出現的比例較高，與實驗室配製的氯化銨溶液有相同的結果，且當暴露濃度比例降低至 20%時銨離子濃度約為 40 mg/L，此時胚胎大部分為脊椎彎曲的畸形型態，跟實驗室配製溶液暴露結果有相同的現象，且本研究在 4-1 死亡率的章節有測得氯化銨的 LOEC 濃度為 0.41 mg NH₃-N/L，主要出現的型態亦以脊椎彎曲為主。此毒性暴露結果可證實胚胎在暴露低濃度的實場出流水雖然死亡率不高，但是會抑制胚胎的孵化率，且會減緩胚胎的心跳速率進而影響生長體長，而主要誘發幼魚發育異常的表現型態為脊椎彎曲，此現象亦代表低濃度的銨離子會對水體生物產生發育的影響，因此如單以法規濃度去規範水體銨離子的濃度仍有可能有遺漏的部分。

第五章 結論與建議

5.1 結論

本研究使用斑馬魚胚胎毒性試驗評估實驗室配製模擬含氮廢水，以及含氮半導體廢水的生物急毒性，並藉由觀察不同的觀測終點瞭解胚胎發育的過程，由結果可得到以下的結論。

- (1) 斑馬魚胚胎經模擬含氮廢水暴露後，可得知氯化銨、硝酸鈉與氫氧化四甲基銨的 96 小時半數致死濃度分別為 111 mg NH₃-N/L、1347.3 mg NO₃⁻-N/L 與 68.1 mg N/L；而最低效應濃度(LOEC)則分別為 0.41 mg NH₃-N/L、0.51 mg NO₃⁻-N/L 及 0.1 mg N/L。
- (2) 斑馬魚胚胎暴露於模擬含氮廢水會產生孵化率延緩、心跳次數下降、生長速度減緩與畸型發育等現象，而畸型發育的型態有三種，出現的先後順序為脊椎彎曲最先發生，其次為心包膜腫大，卵黃囊腫大最後出現。
- (3) 經氯化銨與氫氧化四甲基銨暴露的斑馬魚胚胎，其發育所出現的主要畸形型態為脊椎彎曲，而暴露於硝酸鈉的斑馬魚胚胎，主要的畸形發育型態則為心包膜腫大。
- (4) 半導體廢水的斑馬魚胚胎毒性試驗結果顯示，暴露於氟系與化學研磨製程混合廢水的死亡率為 77%，而製程酸鹼廢水與經處理過的出流水之死亡率皆低於 20%。在累積孵化率、心跳與體長有降低的趨勢，以心跳受到抑制的現象最為顯著，同時伴隨脊椎彎曲、心包膜腫大及卵黃囊腫大的畸形發育情形，其中又以酸鹼廢水所誘發的致畸率最高(97%)。
- (5) 某半導體廠廢水毒性評估結果，推測氟系與化學研磨製程混合廢水導致胚胎畸形發育的毒性物質為銨離子與硝酸鹽離子，製程酸鹼廢水可能是未偵測出的物質所產生之影響，抑或是物質間毒性加成作用所致，而出流水主要產生毒性之物質則為銨離子。

- (6) 半導體廢水毒性暴露結果雖為低死亡率，卻可從其他觀測終點如累積孵化率、心跳、體長與致畸率得到毒性物質對胚胎的影響，此優勢為傳統毒性偵測所缺乏，未來可用斑馬魚胚胎評估出流水對水體的潛在危害性。

5.2 建議

- (1) 實驗所採的三股廢水皆無偵測到氫氧化四甲基銨的存在，無法評估含有機氮的半導體實廠廢水其斑馬魚胚胎毒性，因此未來可採集含氫氧化四甲基銨的實場廢水進行毒性評估。
- (2) 為了探討斑馬魚胚胎暴露含氮物質的半數致死濃度範圍，所取用的暴露濃度較高，以致於無法確定胚胎暴露後最先受到影響的部位，因此可再降低暴露濃度，以便釐清斑馬魚胚胎對每一種含氮物質最敏感的實驗終點，更可深入瞭解毒性作用的機制。
- (3) 由於本實驗所採的半導體廢水中氟離子的濃度較高，且每個物種對毒性物質的耐受度不同，因此未來會針對斑馬魚暴露於氟離子的毒性反應進行評估。

參考文獻

- Asharani P. V., Wu Y. L., Gong Z., Valiyaveetil S. (2008) "Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models" *Nanotechnology*, 19, 255102 (8pp).
- Braunbeck T., Böttcher M., Hollert H., Kosmehl T., Lammer E., Leist E., Rudolf M., Seitz N. (2005) "Towards an alternative for the acute fish LC₅₀ test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species – an update" *Alternative to Animal Experimentation*, 22, 2–15.
- Camargo J. A. (2003) "Fluoride toxicity to aquatic organisms: a review" *Chemosphere*, 50, 251–264.
- Camargo J. A., Alonso A., Salamanca A. (2005) "Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates" *Chemosphere*, 58, 1255–1267.
- Carlsson G., Patring J., Kreuger J., Norrgren L., Oskarsson A. (2013) "Toxicity of 15 veterinary pharmaceuticals in zebrafish (*Danio rerio*) embryos" *Aquatic Toxicology*, 126, 30–41.
- Chambers P. A., Guy M., Roberts E. S., Charlton M. N., Kent R., Gagnon C., Grove G., Foster N. (2001) "Nutrients and their impact on the Canadian environment" *Health Canada and Natural Resources Canada*, 21, 205–215.
- Chang K. F., Yang S. Y., You H. S., Pan J. R. (2008) "Anaerobic treatment of tetra-methyl ammonium hydroxide (TMAH) containing wastewater" *Transactions on Semiconductor Manufacturing*, 21, 486–491.
- Chen G., White P. A. (2004) "The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review" *Mutation Research*, 567, 151–225.
- Cheng J., Flahaut E., Cheng S. H. (2007) "Effect of carbon nanotubes on developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos" *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26, 708–716.
- Deng J., Yu L., Liu C., Yu K., Shi X., Yeung L. W. Y., Lam P. K. S., Wu R. S. S., Zhou B. (2009) "Hexabromocyclododecane-induced developmental toxicity and apoptosis in zebrafish embryos" *Aquatic Toxicology*, 93, 29–36.
- Embry M. R., Belanger S. E., Braunbeck T. A., Galay-Burgos M., Halder M., Hinton D. E., Léonard M. A., Lillicrap A., Norberg-King T., Whale G. (2010) "The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research" *Aquatic Toxicology*, 97, 79–87.
- Esch C., Sliker R., Wolterbeek A., Woutersen R., Groot D. (2012) "Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing: A mini review" *Neurotoxicology and Teratology*, 34, 545–553.

- Frayse B., Mons R., Garric J. (2006) "Development of a zebrafish 4-day embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals" *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63, 253–267.
- Garcia-Camero J. P., Catala M., Valcarcel Y. (2012) "River waters induced neurotoxicity in an embryo–larval zebrafish model" *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 84, 84–91.
- Hallare A. V., Kohler H. R., Triebkorn R. (2004) "Developmental toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent, DMSO" *Chemosphere*, 56, 659–666.
- Hallare A., Nagel K., Köhler H. R., Triebkorn R. (2006) "Comparative embryotoxicity and proteotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (*Danio rerio*) embryos" *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63, 378–388.
- Hamlin H.J. (2006) "Nitrate toxicity in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*)" *Aquaculture*, 253, 688–693.
- Hill A., Howard V., Cossins A. (2004) "Characterization of TCDD-induced craniofacial malformations and retardation of zebrafish growth" *Journal of Fish Biology*, 64, 911–922.
- Hill A. J., Teraoka H., Heideman W., Peterson R. E. (2005) "Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity" *Toxicological Sciences*, 86, 6–19.
- Huynh C. K., Rutten M. J., Cohen S. L., Nadeau D.P., Jurjevic R. A., Gilhooly J. A. (1998) "Process for removing residue from a semiconductor wafer after chemical-mechanical polishing" *International Business Machines Corporation*, 6, 134–156.
- Incardona J. P., Collier T. K., Scholz N. L. (2004) "Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons" *Toxicology and Applied Pharmacology*, 196, 191–205.
- Jiang J. Q., Zhou Z., Patibandla S., Shu X. (2013) "Pharmaceutical removal from wastewater by ferrate(VI) and preliminary effluent toxicity assessments by the zebrafish embryo model" *Microchemical Journal*, 110, 239–245.
- Kallqvist T. and Svenson A. (2003) "Assessment of ammonia toxicity in tests with the microalga, *Nephroselmis pyriformis*, Chlorophyta" *Water Research*, 37, 477–484.
- Kern W. (1990) "The evolution of silicon wafer cleaning technology" *Journal of the Electrochemical Society*, 137, 1887–1892.
- Kimmel C. B., Ballard W. W., Kimmel S. R., Ullmann B., Schilling T. F. (1995) "Stages of embryonic development of the zebrafish" *Developmental Dynamics*, 203, 253–310.
- Kır M., Kumlu M., Eroldogan O.T. (2004) "Effects of temperature on acute toxicity of ammonia to

Penaeus semisulcatus juveniles” *Aquaculture*, 241, 479–489.

Lammer E., Carr G.J., Wendler K., Rawlings J.M., Belanger S.E., Braunbeck Th. (2009) “Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test?” *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 149, 196–209.

Lawrence C. (2007) “The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review” *Aquaculture*, 269, 1–20.

Lee C. H., Wang C. L., Lin H. F., Chai C. Y., Hong M. Y., Ho C. K. (2011) “Toxicity of tetramethylammonium hydroxide: Review of two fatal cases of dermal exposure and development of an animal model” *Toxicology and Industrial Health*, 27, 497–503.

Lemarie G., Dosdata A., Covesa D., Dutto G., Gassetta E., Ruyet J. P. (2004) “Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles” *Aquaculture*, 229, 479–491.

Lin Y. F., Swinburne I., Yelon D. (2012) “Multiple influences of blood flow on cardiomyocyte hypertrophy in the embryonic zebrafish heart” *Developmental Biology*, 362, 242–253.

Marugána J., Brua D., Pablosa C., Catalá M. (2012) “Comparative evaluation of acute toxicity by *Vibrio fischeri* and fern spore based bioassays in the follow-up of toxic chemicals degradation by photocatalysis” *Journal of Hazardous Materials*, 213–214, 117–122.

Mishra S., Barik S.K., Ayyappan S., Mohapatra B.C. (2000) “Fish bioassays for evaluation of raw and bioremediated dairy effluent” *Bioresource Technology*, 72, 213–218.

Miyachi Y., Kanao T., Okamoto T. (2003) “Marked depression of time interval between fertilization period and hatching period following exposure to low-dose X-rays in zebrafish” *Environmental Research*, 93, 216–219.

Naddy R. B., Tappa K., Rehner A. B., Pillarda D. A., Schrage L. (2011) “Identifying the cause of toxicity in an algal whole effluent toxicity study—An unanticipated toxicant” *Chemosphere*, 85, 1026–1032.

OECD (1992) “Fish, Early Life Stage Toxicity Test (Guideline 210)” p. 9.

Scholz S., Fischer S., Gündel U., Küster E., Luckenbach T., Voelker D. (2008) “The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing” *Environmental Science and Pollution Research*, 15, 394–404.

Scott G. and Crunkilton R. L. (2000) “Acute and chronic toxicity of nitrate to fathead minnows (*Pimephales promelas*), *Ceriodaphnia dubia*, and *Daphnia magna*” *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 2918–2922.

Selderslaghs I. W. T., Rompay A. R. V., Coen W. D., Witters H. E. (2009) “Development of a

screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo” *Reproductive Toxicology*, 28, 308–320.

Serbedzija G. N., Flynn E., Willett C. E. (1999) “Zebrafish angiogenesis: A new model for drug screening” *Angiogenesis*, 3, 353–359.

Shi X., Gu A., Ji G., Li Y., Di J., Jin J., Hu F., Long Y., Xia Y., Lu C., Song L., Wang S., Wang X. (2011) “Developmental toxicity of cypermethrin in embryo-larval stages of zebrafish” *Chemosphere*, 85, 1010–1016.

Smolders R., Bervoets L., Boeck G., Blust R. (2002) “Integrated condition indices as a measure of whole effluent toxicity in zebrafish embryo (*Danio rerio*)” *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 87–93.

Thurston R. V., Russo R. C., Vinogradov G. A. (1981) “Ammonia toxicity to fishes. Effect of pH on the toxicity of the un-ionized ammonia species” *American Chemical Society*, 15, 837–840.

Tietge J. E., Ankley G. T., Defoe D. L., Holcombe G. W., Jensen K. M. (2000) “Effect of water quality on development of *Xenopus laevis*: a frog embryo teratogenesis assay–*Xenopus* assessment of surface water associated with malformation in native anurans” *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 2114–2121.

Tislera T., Zagorc-Koncanb J., Cotmana M., Drolic A. (2004) “Toxicity potential of disinfection agent in tannery wastewater” *Water Research*, 38, 3503–3510.

Wedekind C., Siebenthal B., Gingold R. (2007) “The weaker points of fish acute toxicity tests and how tests on embryos can solve some issues” *Environmental Pollution*, 148, 385–389.

Weinstein D. I. and Kimmel E. (1998) “Behavioral response of carp (*Cyprinus carpio*) to ammonia stress” *Aquaculture*, 165, 81–93.

Wollenbergera L., Halling-Sørensenb B., Kusk K.O. (2000) “Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*” *Chemosphere*, 40, 723–730.

Wu C. L., Su S.B., Chen J. L., Lin H. J., Guo H. R. (2008) “Mortality from dermal exposure to tetramethyl ammonium hydroxide” *Journal of Occupational Health*, 50, 99–102.

Yang L., Ho N. Y., Alshut R., Legradi J., Weiss C., Reischl M., Mikut R., Liebel U., Müller F., Strähle U. (2009) “Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals” *Reproductive Toxicology*, 28, 245–253.

Zhu X., Zhu L., Duan Z., Qi R., Li Y., Lang Y. (2008) “Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage” *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 43, 278–284.

王明朗，「認識台灣半導體產業」，台灣綜合研究院，2003 年。

王俊明，「半導體廠廢水生物急毒性之研究」，瑞晶電子股份有限公司，2011 年。

周珊珊，「高科技產業廢水處理與回收技術」，工業技術研究院，2010 年。

李驊穎，「銀鱗鯧的胚胎、仔稚魚發育及對氨氮急毒性耐受性之研究」，國立東華大學海洋生物多樣性及演化研究所，2011 年。

陳富美，「氨對多齒新米蝦之毒性影響研究」，國立臺灣大學漁業科學研究所，2007 年。

龍采玟，「磷苯二甲酸二丁酯對斑馬魚胚胎的毒性影響」，國立雲林科技大學環境與安全衛生工程系，2011 年。

